

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude de la fonction de Hyal1 dans la physiologie de l'épiderme

Evrard, Céline

Award date:
2015

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

Étude de la fonction de Hyal1 dans la physiologie de l'épiderme

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Céline EVRARD

Janvier 2015

Étude de la fonction de Hyal1 dans la physiologie de l'épiderme

EVRARD Céline

Résumé

L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycan réparti dans de nombreux tissus de l'organisme. La majorité de cet HA se retrouve dans la peau, dont une grande quantité est présente dans le derme où il joue un rôle d'hydratation par rétention d'eau. L'acide hyaluronique est également présent dans l'épiderme mais sa fonction exacte dans ce tissu n'est pas encore connue. Dès lors, l'étude du métabolisme de l'HA dans l'épiderme apparaît cruciale. Les HA synthases (HAS1, 2 et 3) ont récemment été caractérisées. En revanche, le rôle des hyaluronidases, et plus précisément de HYAL1, impliquées dans le catabolisme de l'HA n'a pas encore été étudié dans les épidermes. Dans ce projet, deux modèles complémentaires ont été utilisés, un modèle *in vitro* basé sur la reconstruction d'épidermes humains, ainsi que sur la culture en monocouche autocrine et un modèle *in vivo* faisant intervenir des souris. Tout d'abord, les études d'abondance protéique et d'activité enzymatique de HYAL1 sur les épidermes reconstruits ont mis en évidence que HYAL1 est exprimé, mais aussi actif, dès le premier jour de la reconstruction. De plus, cette enzyme apparaît spécifiquement localisée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme. Afin de mieux comprendre le rôle de HYAL1, des épidermes reconstruits et des cultures en monocouche rendues déficientes en HYAL1 à l'aide de shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1 ont tenté d'être générés. Le knockdown des kératinocytes pour HYAL1 s'avérant impossible, des études sur la peau de souris déficientes en Hyal1 (Hyal1^{-/-}) ont été réalisées. Bien que les souris déficientes en Hyal1 montrent une morphologie identique aux souris sauvages, une augmentation de la quantité d'acide hyaluronique a été observée dans le derme des souris déficientes en Hyal1. Mieux encore, la concentration en acide hyaluronique au niveau de la couche cornée des épidermes des souris déficientes en Hyal1 s'est trouvée plutôt augmentée par rapport aux souris sauvages. Ces résultats soulignent le rôle de dégradation de l'acide hyaluronique joué par la hyaluronidase 1 dans l'épiderme. Bien que l'HA soit dégradé, celui-ci est néanmoins physiologiquement présent dans la couche cornée des épidermes, suscitant des interrogations quant à l'intérêt physiologique de la dégradation de l'HA qui conserve tout de même des fragments de petite taille dans les couches supérieures de l'épiderme.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: Y. Poumay ; **Co-promoteur:** B. Flamion

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, Mr Y. Poumay, qui a eu la gentillesse et la patience de m'accueillir et de me faire profiter de son laboratoire. Ses conseils et le temps qu'il m'a accordés tout au long de la réalisation de ce mémoire ont été des plus précieux. J'y associe également Mr B. Flamion pour ses petits conseils avisés et le savoir qu'il m'a apportés. Un grand merci à ses deux professeurs pour leur soutien et leurs petites phrases encourageantes.

Ensuite, mes plus vifs remerciements s'adressent à Jérémy Malaisse, mon encadrant, sans qui ce travail n'aurait certainement pas été possible. Son appui indéfectible, son enthousiasme, sa motivation, son investissement personnel (notamment durant les weekends mais aussi au travers de nos longues discussions statistiques) ainsi que ses encouragements tout au long de cette année de mémoire ont été pour moi une indispensable source de motivation.

Je m'en voudrais de ne pas citer tous les membres du LabCeTi et du LNR pour leur accueil et leur gentillesse. Chacun à son niveau a contribué de près ou de loin à rendre ce travail agréable et passionnant. Je remercie Catherine pour le temps consacré à lire chaque partie de mon travail ainsi que pour ses pertinents conseils. Merci également à Kathleen, Valérie et Daniel qui ont toujours été à mon écoute, prêts à rendre service et à partager leurs connaissances techniques mais aussi aux doctorantes Aurélie, Evelyne, Emilie et Joanna pour les bons moments passés en leur compagnie. Je terminerai en citant Séverine, Abdallah et Benoit pour leur bonne humeur quotidienne.

Merci à tous les doctorants des autres laboratoires avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

Je remercie les membres de mon jury, Benoit Muylkens, Marielle Boonen, Vanessa Colombaro et Edith Roegiers pour avoir accepté de lire ce mémoire.

Enfin, je ne peux qu'être reconnaissante envers mes parents, mon frère et ma sœur pour leur soutien inconditionnel, leur dévouement, leur écoute et leurs encouragements tout au long de mes études.

La reconnaissance est la mémoire du cœur
de Hans Christian Andersen

Table des matières

INTRODUCTION

1. L'acide hyaluronique.....	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Fonctions.....	2
1.3. Synthèse.....	4
1.4. Dégradation.....	5
1.5. Localisation de l'acide hyaluronique.....	6
2. La peau.....	7
2.1. Hypoderme.....	7
2.2. Derme.....	7
2.3. Épiderme.....	8
2.3.1. Structure.....	8
2.3.2. Fonctions.....	11
2.3.3. Processus de différenciation.....	11
2.3.4. Rôle de l'acide hyaluronique dans l'épiderme.....	12
3. Premières connaissances sur HYAL1 dans l'épiderme.....	15
3.1. Modèle de culture des kératinocytes.....	15
3.2. Expression et activité de HYAL1.....	16
4. Objectif du mémoire.....	17

MATÉRIEL & MÉTHODES

A. <i>IN VITRO</i>	18
1. Culture de kératinocytes humains.....	18
1.1. Culture primaire.....	18
1.2. Culture secondaire.....	18
1.3. Culture tertiaire.....	19
1.3.1. Monocouche.....	19
1.3.2. Épiderme reconstruit.....	19
2. Inhibition de l'expression ou de l'activité de HYAL1.....	20
2.1. Inhibition de l'expression de HYAL1 à l'aide de vecteurs lentiviraux.....	20
2.2. Inhibition de l'activité de HYAL1 à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique..	20

3. Traitement des échantillons – mise en paraffine.....	20
4. Coloration topographique.....	21
5. Marquage immunohistochimique.....	21
6. Marquage fluorescent HA/HYAL1 et 2.....	21
7. Étude des protéines d'épidermes reconstruits par Western-Blot.....	22
7.1. Extraction et dosage protéique.....	22
7.2. Western-blot.....	22
8. Étude de l'activité enzymatique par zymographie.....	23
8.1. Extraction des protéines des épidermes reconstruits.....	23
8.2. Zymographie.....	23
9. Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR.....	24
9.1. Extraction d'ARN de cultures cellulaires.....	24
9.2. Reverse Transcription.....	25
9.3. PCR quantitative.....	25
 B. <i>IN VIVO</i>	 26
1. Souris adultes.....	26
2. Analyses histologiques.....	26
3. Mesure du pH cutané et de la résistance électrique trans-épidermique (TEER)...	26
4. Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR.....	27
5. Dosage HA (ELISA-like)	27
6. Embryons et test de barrière.....	28
6.1. Les embryons E16.5 et E17.5.....	28
6.2. Test de barrière.....	28

RÉSULTATS

A. Résultats <i>IN VITRO</i>	29
1. Étude de HYAL1 durant la reconstruction d'un épiderme humain.....	29
1.1. Morphologie et distribution de l'acide hyaluronique et de HYAL1 lors de la reconstruction d'un épiderme humain.....	29
1.2. Abondance protéique et activité enzymatique de HYAL1 lors de la reconstruction d'un épiderme humain.....	30
1.3. Mises au point de la technique 'lentivirus' sur épidermes reconstruits.....	31
1.4. Infection par lentivirus sur des épidermes humains reconstruits.....	32
2. Étude d'une déficience en HYAL1 dans les kératinocytes humains en monocouche.....	32
2.1. Morphologie et viabilité des kératinocytes infectés par des particules virales	33
2.2. Expression relative de HYAL1 et de marqueurs de différenciation à différents stades de confluence.....	34
2.3. Suivi de l'infection : morphologie et viabilité des kératinocytes.....	36
2.4. Expression relative de HYAL1 et de marqueurs de différenciation 72h post-infection.....	37
2.5. Activité enzymatique de HYAL1 72h post-infection.....	37
3. Étude d'une inhibition de l'activité de HYAL1 dans les kératinocytes humains cultivés en monocouche à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique.....	38
3.1. Viabilité des kératinocytes après incubation avec l'inhibiteur pharmacologique.....	38
3.2. Activité enzymatique de HYAL1 après incubation avec l'inhibiteur pharmacologique.....	38
B. Résultats <i>IN VIVO</i>	39
1. Morphologie et distribution de marqueurs de différenciation et de l'acide hyaluronique dans l'épiderme de souris.....	39
2. Dosage de l'acide hyaluronique présent dans la couche cornée.....	40
3. Mesures du pH cutané et de la résistance électrique trans-cutanée de la peau de souris.....	41
4. Perméabilité de la barrière épidermique.....	41
5. Expression relative des ARNm de Hyal1, Hyal2, Hyal3, β -hexosaminidase A et B dans les kératinocytes de souris.....	42

DISCUSSION & CONCLUSION

1. Caractérisation de HYAL1 dans un épiderme humain.....	43
2. Inhibition de HYAL1.....	44
3. Étude de la souris déficiente en Hyal1.....	45
4. Perspective – rôle de Hyal2.....	48

RÉFÉRENCES

Références.....	51
-----------------	----

Liste des abréviations

NAK	Normal abdominal keratinocyte
4-MU	4-methylumbelliferone
ADN	Acide désoxyribonucléique
APS	Persulfate d'ammonium
ARNm	Acide ribonucléique messager
BPE	Bovine Pituitary Extracts
BSA	Bovine serum albumin
C	Confluence
CD44	Cluster of differentiation 44
CLD1	Claudine 1
Cq	Cycle quantify
dFCS	Dialyzed fetal calf serum
DMSO	Dimethylsulfoxide
dNTP	Désoxy-nucléotides tri-phosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétate
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP SK	Epithélium pavimenteux stratifié kératinisé
FLG	Filaggrine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Acide hyaluronique
HABP	Hyaluronic acid binding protein
HAS	Hyaluronic acid synthase
HES	Hémalun – érythrosine – safran
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement
HRP	Horseradish peroxidase
HYAL	Hyaluronidase (<i>in vitro</i>)
Hyal	Hyaluronidase (<i>in vivo</i>)
HZ	Hétérozygote
IVL	Involucrine
K ou KRT	Kératine
KBM	Keratinocyte basal medium
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KGM	Keratinocyte growth medium
KO	Knockout = déficient

LOR	Loricrine
MCDB	Milieu de Dulbecco modifié balancé
NMF	Natural Moisturization Factor
NT	Non-target
OCL	Occludine
OPAA	Acide O-Palmitoyl-L-ascorbic
PBS	Phosphate buffer saline
(q)PCR	Polymerase chain reaction (en temps réel)
Phyal	Hyaluronidase pseudogène
RHAMM	Receptor for hyaluronic-acid-mediated motility
RHE	Reconstructed human epidermis
RPL13a	Ribosomal protein L13a
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
RQ	Relative quantification
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
shRNA	Small hairpin RNA
Spam	Sperm adhesion molecule (Hyaluronidase PH-20)
StrepH	Hyaluronidase de <i>Streptomyces</i>
TEER	Résistance électrique trans épidermique
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGF- β	Transforming growth factor bêta
TGM	transglutaminase
TMEM45a	Transmembrane protein 45a
UV	Ultra-violet
WT	Wild-type = sauvage
ZO-1	Zona occludens
β -Hex	β -Hexosaminidase

INTRODUCTION

1. L'acide hyaluronique :

1.1. Généralités :

L'acide hyaluronique (HA), aussi appelé hyaluronan, est un glycosaminoglycan non-sulfaté présent dans la matrice extracellulaire en grande partie, mais également en petite quantité dans la matrice péricellulaire. Ce sucre est composé d'unités disaccharides répétées : l'acide D-glucuronique et le D-N-acétylglucosamine. Ces deux sucres sont liés entre eux par des liaisons β -1.4 et β -1.3 de manière à former un long polymère [figure 1] (Sakai, Yasuda, Sayo, Ishikawa, & Inoue, 2000). Bien que la molécule de HA soit un glycosaminoglycan, la synthèse n'a pas lieu dans l'appareil de Golgi comme les autres polymères de cette famille. En effet, le polymère est assemblé au niveau de la face interne de la membrane cellulaire et est extrudé dans la matrice extracellulaire en s'allongeant par ajout des unités disaccharides. Ce mécanisme permet la formation de molécules de haut poids moléculaire allant de 10^5 à 10^7 daltons et d'une longueur de 2 à 25 μ m (Toole, 2004).

La synthèse de l'HA à la face interne de la membrane cellulaire lui confère des caractéristiques hydrodynamiques et physicochimiques particulières. En effet, sa structure primaire ne contient pas de peptide et prend la forme d'un polysaccharide linéaire. Cette structure relativement simple et uniforme confère à ce polymère des capacités de liaison avec d'autres molécules de matrice (Fraser, Laurent, & Laurent, 1997). L'association de l'acide hyaluronique avec les autres macromolécules se trouvant dans la matrice extracellulaire donne naissance à une structure supramoléculaire complexe permettant une importante rétention d'eau et des propriétés de viscoélasticité [figure 2] (Laurent et al., 1992) (Toole, 2004).

En plus de son interaction avec les macromolécules de la matrice, l'acide hyaluronique s'associe aussi à la surface des cellules au niveau de récepteurs spécifiques. Le principal récepteur de l'acide hyaluronique est la protéine transmembranaire CD44. Ce récepteur est abondamment présent à la surface de nombreux types cellulaires (Underhill, 1992). RHAMM (receptor for hyaluronic-acid-mediated motility) est un deuxième récepteur de l'HA, moins connu. La liaison d'une molécule d'acide hyaluronique sur un de ces deux récepteurs provoque la transduction de divers signaux intracellulaires pouvant avoir un impact sur la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire (Toole, 2004).

L'acide hyaluronique, présent chez tous les vertébrés, a été découvert dans les années 1930 par le chercheur Karl Meyer. D'abord mis en évidence dans la substance fondamentale de l'humeur vitrée de l'œil (Meyer & Palmer, 1934), diverses études sur la distribution et la concentration en acide hyaluronique ont démontré sa présence dans plusieurs tissus et organes. Une certaine quantité d'HA est trouvée dans les organes internes (les reins, les poumons, les intestins, le cerveau ou l'estomac) mais il est aussi présent dans les muscles, le squelette et les tissus de soutien ainsi que les tissus conjonctifs particuliers, à savoir le cordon ombilical, la synovie des cartilages et l'humeur vitrée. Enfin, l'acide hyaluronique est localisé à raison de 50% dans la peau (Fraser et al., 1997) (Nusgens, 2010). La peau représentant le réservoir le plus important d'acide hyaluronique, nous reviendrons plus tard sur la localisation plus spécifique de l'HA dans cet organe.

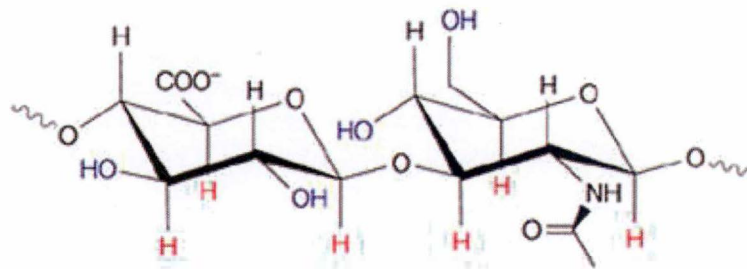


Figure 1 : Structure d'un disaccharide d'acide hyaluronique composé d'acide D-glucuronique (à gauche) et de D-N-acétylglucosamine (à droite) (Toole 2004)



Figure 2 : Propriété de viscoélasticité de l'acide hyaluronique
(<http://www.32ndstreet.com/index.php/skin-care-products/anti-wrinkles/hyaluronic-acid-serum.html>)

1.2. Fonctions :

Bien que possédant une structure relativement simple, l'HA est caractérisé par un nombre de fonctions et une complexité remarquable. Tout d'abord, la capacité de liaison de la molécule d'acide hyaluronique avec les autres macromolécules présentes dans la matrice extracellulaire permet la formation d'un réseau complexe intervenant dans la structuration de la matrice ainsi que dans la rétention d'eau et l'hydratation des tissus. De par sa capacité de liaison avec des récepteurs présents à la surface cellulaire, l'acide hyaluronique est capable de réguler diverses voies de signalisation intracellulaire. L'acide hyaluronique est également impliqué dans l'embryogenèse et les développements de structures précoces telles que le cœur et le squelette. Il intervient dans l'inflammation, l'angiogenèse et les processus cancéreux. Les phénomènes d'immunité et de cicatrisation sont aussi influencés par ce polymère. Et enfin, l'acide hyaluronique est fortement impliqué dans l'hydratation de la peau.

Formation et structuration de la matrice extracellulaire :

Lors de sa synthèse, l'acide hyaluronique est extrudé dans la matrice extracellulaire. Ce glycosaminoglycan simple et linéaire est capable de s'associer de manière stable à de nombreux autres glycosaminoglycans sulfatés par l'intermédiaire d'une protéine possédant un domaine amino-terminal G1 particulier. L'interaction de l'ensemble de ces molécules forme un protéoglycan. Cette liaison de l'HA avec les autres glycosaminoglycans forme un premier niveau complexe. En présence des fibres de collagène, l'organisation se complique et forme un complexe supramoléculaire (Lee & Spicer, 2000).

En plus de cette organisation complexe, l'acide hyaluronique est chargé négativement. Les molécules d'eau étant polaires, ce glycosaminoglycan va naturellement se dissoudre dans l'eau. Cela induit une forte rétention d'eau au vu de la capacité de l'HA à retenir jusqu'à 70% de son poids en eau (Anandagoda, Ezra, Cheema, Bailly, & Brown, 2012). Dès lors, la présence d'acide hyaluronique confère au tissu une forte capacité à se déformer et une certaine viscosité. Dans des tissus tels que les cartilages, cela permet notamment de lubrifier les articulations et d'amortir les chocs.

Signalisation intracellulaire :

L'interaction de l'acide hyaluronique avec son récepteur protéique CD44 peut activer une phosphorylation par les protéines kinases ou une activation des Rho-GTPase impliquant RhoA et Rac1. Ces signaux mènent à diverses réponses cellulaires telles que l'adhésion des cellules, la prolifération, la différenciation ou encore la migration cellulaire (Puré & Assoian, 2009).

De façon extrêmement intéressante, il semble que la taille du polymère d'acide hyaluronique généré qui interagit avec le récepteur CD44 détermine également la réponse cellulaire. En effet, les polymères de bas poids moléculaires stimulent la division cellulaire alors que les sucres de hauts poids moléculaires l'inhibent. Ce phénomène d'activation par les polymères de bas poids moléculaires et d'inhibition par ceux de hauts poids moléculaires est applicable pour les différentes voies de signalisation (Puré & Assoian, 2009).

En ce qui concerne le récepteur RHAMM, les mécanismes de liaison de l'HA ainsi que les voies de signalisation induites par ce récepteur diffèrent légèrement de ce qui a été décrit pour CD44. Cependant, les réponses cellulaires apparaissent similaires (Turley, Noble, & Bourguignon, 2002).

Embryogenèse et développement de structures précoces :

L'acide hyaluronique est synthétisé par trois hyaluronan synthases (la synthèse sera expliquée au point 1.3). Parmi ces trois enzymes de synthèse, HAS2 a été défini comme étant l'enzyme la plus active, et donc la plus impliquée, lors de l'embryogenèse. En effet, les facteurs de croissance ont un effet activateur sur l'enzyme HAS2. Celle-ci apparaît alors très active au niveau des cellules cardiaques, des cellules de la crête neurale et des cellules impliquées dans la formation du squelette chez l'embryon (Camenisch et al., 2000).

Lors du stade embryonnaire, la gelée cardiaque contient une grande quantité d'acide hyaluronique. En présence d'acide hyaluronique, les cellules épithéliales se transforment en cellules mésenchymateuses (faisant intervenir diverses modifications biochimiques et morphologiques) (Zoltan-Jones, Huang, Ghatak, & Toole, 2003) (Markwald, Fitzharris, Bank, & Bernanke, 1978).

La concentration en acide hyaluronique intervient également dans la morphogenèse du squelette. Tout d'abord les cellules mésenchymateuses prolifèrent activement sous le contrôle de HAS2 et donc en présence d'une quantité importante d'HA. Cette phase est suivie par une diminution de la quantité d'HA présente dans les espaces intercellulaires qui est simultanée à la réduction de la matrice extracellulaire. Les cellules ne sont alors plus prolifératives (Knudson & Toole, 1985).

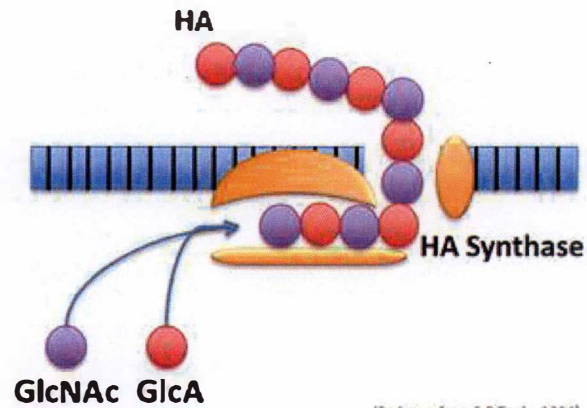
Angiogenèse et cancer :

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire déjà existant pour vasculariser un tissu. Ce développement de nouveaux vaisseaux a lieu principalement lors de l'embryogenèse mais ce processus prend également place lors de la réparation tissulaire. Comme écrit précédemment, la taille des polymères d'HA générés influence le type de réponse. En effet, les polymères de haut poids moléculaires vont inhiber la signalisation cellulaire lors de leur interaction avec le récepteur CD44. À l'inverse, les polymères de bas poids moléculaires vont activer la prolifération des cellules et mener à la formation de néo-vaisseaux (Deed et al., 1997).

De plus, ces oligomères d'HA, activant l'angiogenèse, participent à la migration des cellules tumorales (Rooney, Kumar, Ponting, & Wang, 1995). En outre d'une néo-vascularisation, l'HA présent en grande quantité dans la matrice extracellulaire génère des espaces importants entre les cellules permettant une invasion tissulaire facilitée et plus rapide. Cette augmentation de la concentration d'HA dans les situations cancéreuses a également un effet stimulant sur la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses. Enfin, il limite la détection de la tumeur par le système immunitaire (Girish & Kemparaju, 2007).

Inflammation et immunité :

Lors d'un processus d'inflammation, les cellules immunitaires sont recrutées au niveau de la zone enflammée. Ce processus nécessite un ralentissement du débit sanguin afin de permettre aux leucocytes et aux lymphocytes de s'amarrer à la paroi du vaisseau sanguin et ensuite de traverser l'endothélium. C'est lors de cet amarrage à la paroi que l'acide hyaluronique facilite la migration des cellules de l'immunité. En effet, les cellules immunitaires vont notamment s'attacher à l'HA, lui-même fixé à son récepteur CD44 présent sur la membrane des cellules endothéliales. Cela permet *in fine*, un arrêt des cellules immunitaires avant la migration au travers de la paroi (Johnson, Maiti, Brown, & Li, 2000).



(Redrawn from B.P Toole, 2004)

Figure 3 : Synthèse de l'acide hyaluronique (Toole 2004)

L'acide hyaluronique est synthétisé par un HA synthase à partir de deux sucres simples : le D-N-acétylglucosamine et l'acide glucuronique. Cette synthèse prend place au niveau de la membrane interne de la cellule et le polymère d'HA est sécrété directement dans la matrice extracellulaire.

De plus, en cas d'inflammation, des radicaux libres sont générés. Ceux-ci sont délétères pour les polymères d'acide hyaluronique. En effet, ces radicaux libres clivent l'HA en petits fragments qui sont alors phagocytés par les cellules dendritiques (reconnaissance au niveau des Toll-like Receptor) et reconnus comme étant du « non-soi ». Cela provoque automatiquement l'activation de l'immunité innée. À l'inverse, les fragments d'HA possédant un haut poids moléculaire sont reconnus par le récepteur CD44 et apparaissent anti-inflammatoires (Shirali & Goldstein, 2008).

Hydratation de la peau :

Au niveau de la peau, l'acide hyaluronique joue un rôle important dans l'hydratation du tissu. C'est au niveau du derme (couche intermédiaire de la peau) que se trouve la plus grande quantité d'HA au sein d'une matrice extracellulaire imposante. Une quantité non négligeable d'HA est également présente dans les espaces intercellulaires de l'épiderme (couche superficielle). L'eau est dès lors attirée et retenue au niveau cutané. Cette hydratation est importante pour le bon fonctionnement de la peau et permet également d'absorber les chocs externes (Verdier-sévrain & Bonté, 2007).

Preuve en est, lors du vieillissement de la peau, celle-ci apparaît moins élastique et moins hydratée. Cela est lié à la diminution, voire la disparition de l'HA dans le derme, bien que d'autres facteurs d'hydratation tels que les NMF (Natural Moisturization Factor) soient également présents (Ghersetich, Lotti, Campanile, Grappone, & Dini, 1994) (Stern & Maibach, 2008).

1.3. Synthèse :

Comme mentionné précédemment, l'acide hyaluronique est synthétisé au niveau de la face interne de la membrane cellulaire afin d'être sécrété directement dans la matrice extracellulaire. Les enzymes responsables de cette synthèse, appelées Hyaluronan Synthase (HAS), se trouvent donc au niveau de la membrane plasmique [figure 3] (Weigel, Hascall, & Tammi, 1997).

Chez les mammifères, trois isoenzymes de hyaluronan synthases ont été identifiées et ont été dénommées HAS1, HAS2 et HAS3 (Kirsi Rilla et al., 2005). Ces trois enzymes sont similaires en termes de séquences en acides aminés et de structures. De même les substrats de ses 3 enzymes, l'UDP- α -N-acétyl-D-glucosamine et l'UDP- α -D-glucuronate, sont identiques (Kirsi Rilla et al., 2013).

Cependant, ces enzymes montrent une expression temporelle lors du développement, une activité et une taille de polymère d'HA qui leur sont propres (Itano et al., 1999).

- HAS1 est exprimée durant les phases de gastrulation et de neurulation et est fortement exprimée pendant la différenciation cellulaire. Cette enzyme de synthèse est caractérisée par une activité faible et donc par la production de polymères de haut poids moléculaire. De plus, une étude récente de notre laboratoire a mis en évidence que la principale enzyme responsable de la production d'HA par les kératinocytes (composant majeur de l'épiderme) était la HAS1 (Malaisse et al., 2014).
- HAS2 est caractérisée par une activité plus importante que HAS1, entraînant la formation de polymères de poids moléculaire plus faible que les molécules produites par la HAS1. Cette enzyme joue également un rôle lors du développement (Itano et al., 1999). Il a été montré qu'une délétion du gène HAS2 menait au décès des souriceaux

durant la gestation, alors qu'une délétion des gènes HAS1 ou HAS3 n'apparaît pas létale (Camenisch et al., 2000).

- HAS3, enfin, est l'enzyme la plus active des trois et génère des polymères de bas poids moléculaires (Itano et al., 1999).

1.4. Dégradation :

Les polymères d'acide hyaluronique sont caractérisés par une vitesse de renouvellement importante, impliquant une dégradation rapide des molécules d'HA. En effet, les polymères d'HA possèdent un temps de demi-vie de 2-3 semaines dans les cartilages et 3 à 5 minutes dans le compartiment sanguin. Au niveau cutané, la vitesse de renouvellement est inférieure à 24h dans le derme et est de seulement 2 à 3 heures dans l'épiderme. Il est estimé que pour un individu de 70kg, un tiers de la totalité de l'HA contenu dans son organisme est renouvelé tous les jours (Harada & Takahashi, 2007) (Fraser et al., 1997).

Cette dégradation rapide de l'HA est possible grâce au réseau lymphatique qui assure 85% de la dégradation et à la circulation sanguine qui dirige les fragments d'HA au niveau du foie et des reins.

La dégradation de l'HA est causée en partie par les radicaux libres (dans le cas d'une inflammation par exemple) (Shirali & Goldstein, 2008) mais elle est principalement assurée par une famille d'enzyme de dégradation appelée Hyaluronidase (Hyal). Ces enzymes clivent spécifiquement la liaison β -1.4 des oligosaccharides (Girish & Kemparaju, 2007).

Six gènes codant pour des hyaluronidases ont été identifiés chez l'humain. Ces gènes présentent 40% d'homologie mais leurs localisations et leurs profils d'expression sont distincts :

- Le gène *HYAL1* est localisé sur le chromosome 3 (3p21.3) et code pour la hyaluronidase 1. Il s'agit d'une enzyme de 57kDa dont 49kDa correspondent à une chaîne polypeptidique simple. L'expression la plus importante de l'ARNm de Hyal1 a été détectée dans des organes internes tels que le cœur, le foie, la rate et les reins. Cette enzyme est très active dans le sang mais également dans les urines où elle est présente sous deux formes (57 et 45kDa) (Csoka, Frost, & Stern, 2001). La protéine Hyal1 est également présente dans différents tissus et notamment dans la peau. Au niveau tissulaire, l'enzyme dégrade l'HA en di- ou tétrasaccharides. Il a récemment été montré que Hyal1 est intracellulaire et plus spécifiquement localisée dans les lysosomes, c'est-à-dire dans un compartiment se trouvant à son pH optimum, à savoir un pH acide aux environs de pH 3.7 (Puissant et al., 2014) (Boonen, Puissant, Gilis, Flamion, & Jadot, 2014).
- Le gène *HYAL2* se trouve également sur le chromosome 3 et est adjacent au gène *HYAL1*. Celui-ci code pour une hyaluronidase 2 active. Les protéines Hyal1 et 2 sont structurellement similaires mais se distinguent par leur activité ainsi que leur localisation. Hyal2 a pour particularité d'être ancrée à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI (glycosylphosphatidyl-inositol). De plus, cette enzyme fragmente l'HA en oligosaccharides de 20kDa environ (Girish & Kemparaju, 2007).

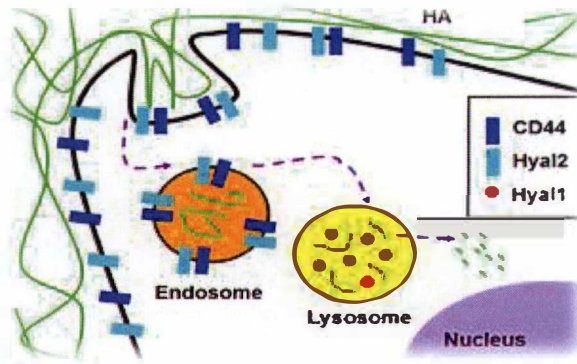


Figure 4 : Modèle de dégradation de l'acide hyaluronique basé sur la collaboration Hyal1 – Hyal2 (Tammi 2001)

L'acide hyaluronique présent dans la matrice extracellulaire se lie aux récepteurs CD44 ancrés dans la membrane plasmique et est dégradé en oligosaccharides par Hyal2 se trouvant à proximité. Simultanément, les fragments d'HA sont endocytés dans des endosomes qui mûrissent en lysosomes. Hyal1 est actif dans ces lysosomes et clive les fragments d'HA en di- ou tétrasaccharides.

- Le gène *HYAL3*, également présent sur le chromosome 3, code pour la hyaluronidase 3. Celle-ci est essentiellement détectée au niveau des testicules et de la moelle osseuse et aurait une importance particulière dans la régulation des cellules souches. La forte conservation du gène entre la souris et l'humain suggère une importance particulière de ce gène. Cependant, l'activité hyaluronidase 3 n'a pas encore été détectée dans les études *in vitro* (Csoka et al., 2001).
- Le gène *HYAL4* est quant à lui présent sur le chromosome 7 (7q31.3) et code pour la hyaluronidase 4. Cette enzyme est exprimée dans le placenta et au niveau du muscle squelettique. Cette enzyme a été identifiée comme étant une chondroïtinase et ne dégrade pas l'acide hyaluronique (Csoka et al., 2001).
- *PHYAL1* est un pseudogène. En d'autres termes, le gène présente deux délétions menant à un codon stop et le rendant non-fonctionnel. Cependant, il est à noter que, chez la souris notamment, ce gène n'a pas subi de mutation et est bien actif (Csoka et al., 2001).
- *SPAM1* également nommée PH-20. Il s'agit d'une hyaluronidase testiculaire puisque liée au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes. Cette dernière est impliquée dans la fécondation. En effet, elle permet la digestion de la matrice extracellulaire et de la zone pellucide de l'ovocyte (Girish & Kemparaju, 2007).

Parmi ces 6 enzymes de dégradation présentes chez les mammifères, seules 3 d'entre elles possèdent une activité hyaluronidase : Hyal1, Hyal2 et Spaml. Spaml a la particularité d'être exprimée exclusivement au niveau testiculaire. En revanche, Hyal1 et Hyal2 sont présentes et actives dans divers types cellulaires et notamment au niveau des kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme (couche superficielle de la peau).

Dès lors, un modèle de dégradation de l'HA a été proposé, basé sur une collaboration entre ces deux enzymes [figure 4] (Tammi et al., 2001) (Stern, 2003) :

Les polymères d'HA de haut poids moléculaires se situent dans la matrice extracellulaire entourant les cellules. C'est au niveau de la membrane cellulaire que l'HA va se lier au récepteur CD44. À proximité de celui-ci, également ancré à la membrane externe de la cellule se situe la hyaluronidase 2. Hyal2 dégrade alors les polymères d'HA de haut poids moléculaire en oligosaccharides de 20kDa. Lors de cette première dégradation, les oligosaccharides sont internalisés dans des endosomes au sein de la cellule. Ces endosomes subissent ensuite un phénomène d'acidification afin de devenir des lysosomes avec un pH de 4. C'est au niveau de ces organites que Hyal1 est présent et actif. Les fragments d'HA sont dès lors clivés par Hyal1 en di- ou tétrasaccharides. Finalement, les petits fragments d'HA sont dégradés par deux β -exoglycosidases, la β -glucuronidase et la β -N-acétylglucosaminidase afin de générer les deux sucres de base (acide D-glucuronique et D-N-acétylglucosamine).

1.5. Localisation de l'acide hyaluronique :

Niveau microscopique :

De façon générale, l'acide hyaluronique étant synthétisé à la face interne de la membrane cellulaire, celui-ci se retrouve en grande quantité au niveau de la matrice extracellulaire des tissus. Cependant, l'internalisation de petits fragments d'HA par les récepteurs CD44 mène à

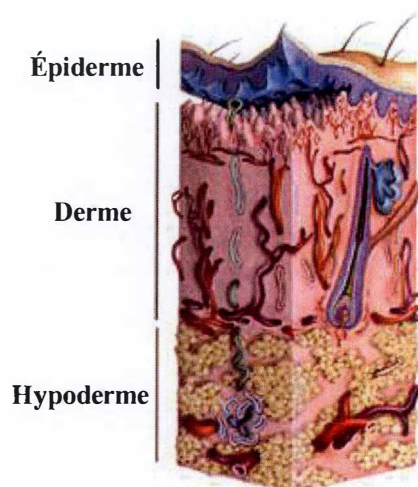


Figure 5 : Schéma des trois tissus composant la peau : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (<http://www.chu-poitiers.fr/f4f47a1f-0fb4-433b-a2f2-b48a9b9f18c2.aspx>).

la présence d'HA intracellulaire. Celui-ci, sous forme de fragments disaccharidiques est difficilement détectable (Sakai et al., 2000).

Niveau macroscopique :

La distribution et la concentration en acide hyaluronique dans l'organisme a été étudiée chez le rat. C'est sur base de ces résultats que la quantité et la distribution de l'HA est estimée chez les mammifères et donc chez l'Homme (Fraser et al., 1997).

Comme précédemment mentionné, une petite quantité de HA (10%) est trouvée dans les organes internes et dans les muscles (8%). Le squelette et les tissus de soutiens ainsi que les tissus conjonctifs représentent une plus grande proportion (27%). Enfin, l'acide hyaluronique est majoritairement présent dans la peau (50%) (Fraser et al., 1997). La peau représente donc un organe d'intérêt pour l'étude du métabolisme de l'acide hyaluronique.

2. La peau :

La peau possède une surface de 1,5 à 2m² et est souvent présentée comme l'organe le plus large du corps. Cet organe représente la première barrière contre les agressions physiques, chimiques ou biologiques de l'environnement externe mais permet également de contenir les fluides internes. Pour assurer au mieux ses fonctions de défenses et de maintien de l'homéostasie, la peau est organisée en trois tissus, du plus profond au plus superficiel : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Divers appendices sont également présents, à savoir des glandes sudoripares et sébacées ainsi que des follicules pileux [figure 5] (Freinkel & Woodley, 2001).

2.1. Hypoderme :

L'hypoderme représente la couche la plus profonde mais aussi la plus épaisse de la peau. Cette couche assure l'interface avec les structures internes et, par son épaisseur, permet une protection mécanique de ces structures. Ce tissu est composé en grande partie d'adipocytes, grandes cellules qui accumulent les acides gras et les glycérides de manière à former des réserves de graisse. Ces stocks de graisse servent d'une part à la thermorégulation de l'organisme et d'autre part comme réserve d'énergie facilement libérable dans le sang. En effet, entre les adipocytes se trouvent du tissu conjonctif composé de nombreux vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses.

2.2. Derme :

Le derme est la couche intermédiaire de la peau, faisant la jonction entre l'hypoderme et l'épiderme. Il s'agit de la principale couche conjonctive de la peau. En effet, celle-ci est composée de fibroblastes qui synthétisent les protéines de la matrice extracellulaire. Un très grand nombre de fibres élastiques conjonctives, de glycosaminoglycans et de fibres collagènes de type I, III et V (75%) s'associent de manière à former un important réseau fibreux et amorphe (Freinkel & Woodley, 2001). Ces éléments confèrent au derme toute son élasticité (grâce aux fibres élastiques) et sa résistance aux tractions (grâce aux fibres de collagène).

Dans cette couche dermique, c'est au niveau de la matrice extracellulaire abondante que se situe l'acide hyaluronique en grande quantité.

Le derme est lui-même divisé en deux couches : le derme réticulaire et le derme papillaire. Le derme réticulaire est la couche la plus profonde et la plus épaisse des deux. Celle-ci est constituée de nombreuses fibres élastiques et collagènes qui s'entrecroisent. Au sein de ce réseau fibreux se situent les appendices cutanés tels que les glandes sébacées et sudoripares ainsi que les follicules pileux. Cette région est également composée de corpuscules de Vater-Pacini et Ruffini, qui innervent le tissu. Par contre le derme papillaire, couche de tissu conjonctif lâche superficiel, est innervé par des corpuscules de Wagner-Meissner. La dénomination « papillaire » correspond aux extensions du derme vers l'épiderme qui donnent un aspect de papilles et renforcent la jonction entre le derme et l'épiderme. Le derme papillaire possède également les fibres collagènes et élastiques mais en moins grandes quantités et celles-ci apparaissent plus fines et mieux organisées. Le composant essentiel du derme papillaire est la substance fondamentale. Ces deux couches du derme sont également richement vascularisées (Hérin, 2012).

L'ensemble de la structure du derme lui confère diverses fonctions. Le réseau vasculaire irriguant le derme papillaire et le derme réticulaire participe à la régulation thermique. Les différentes terminaisons nerveuses (Vater-Pacini, Ruffini, Wagner-Meissner) jouent un rôle de récepteurs aux stimuli. Enfin, l'imposante matrice extracellulaire absorbe les chocs d'une part et la présence d'acide hyaluronique au sein de cette matrice permet la rétention d'eau et l'hydratation cutanée d'autre part.

2.3. Épiderme :

La couche la plus superficielle de la peau est l'épiderme. Elle est donc à l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur. Ce tissu est déposé sur une lame basale qui constitue la jonction avec le derme sous-jacent. L'épiderme est lui-même composé de plusieurs couches cellulaires dont l'épaisseur varie selon la localisation. Les zones les plus fines, telles que les paupières, ont une épaisseur de 50µm environ. Au niveau de la paume des mains et la plante des pieds, l'épiderme atteint son épaisseur maximale avec 1 mm (<http://biologiedelapeau.fr/>). L'épiderme peut se qualifier comme un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK). Cet épiderme, subdivisé en différentes couches de cellules, est en constant renouvellement. Avec une balance finement régulée entre la prolifération des cellules basales et la desquamation des cellules mortes superficielles, on considère que l'ensemble de l'épiderme est renouvelé tous les 45 jours environ (31 jours de renouvellement des kératinocytes et 14 jours de renouvellement des cornéocytes) (Bergstresser & Taylor, 1977) (Iizuka, 1994).

2.3.1. Structure :

Composants cellulaires

L'épiderme est composé de 4 types cellulaires. Représentant 90 à 95% de la population cellulaire de l'épiderme, les kératinocytes constituent le type cellulaire majoritaire de l'épiderme. Entre ces cellules se trouvent des mélanocytes, des cellules de Langerhans, ainsi que des cellules de Merkel, chacune possédant des caractéristiques qui leur sont propres. Ce tissu ne contient aucun vaisseau sanguin, les nutriments et l'oxygène nécessaire aux cellules diffusant à partir du derme sous-jacent.

Les *mélanocytes* sont des cellules dérivées des crêtes neurales au cours du développement. Ces cellules sont localisées au niveau basal de l'épiderme, c'est-à-dire directement en contact avec la lame basale. Cependant, ces cellules possèdent des prolongements qui s'insinuent

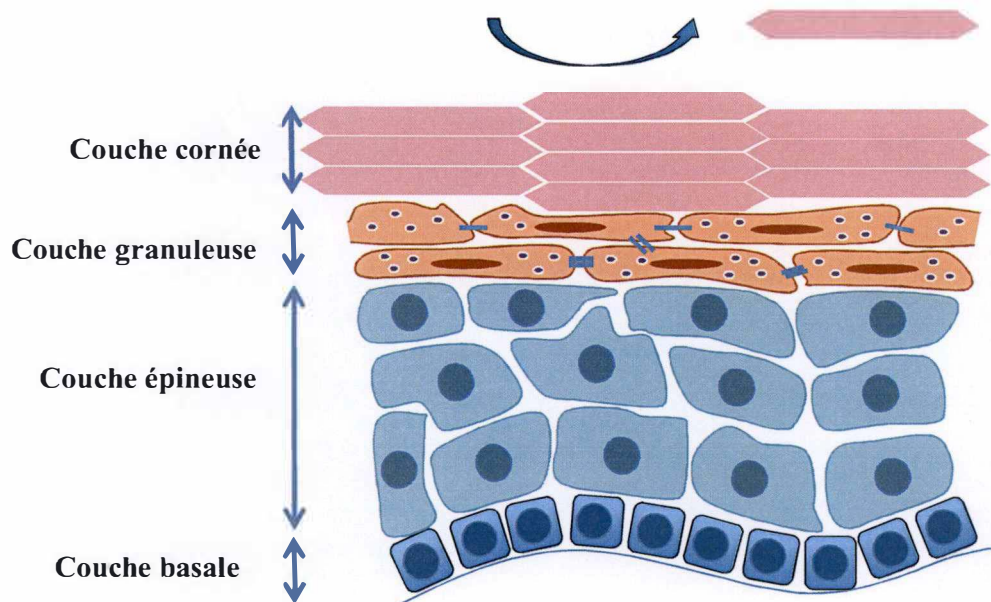


Figure 6 : Schéma représentant l'épiderme composé de 4 couches de kératinocytes en différenciation : couche basale, couche épineuse, couche granuleuse, couche transitoire et couche cornée (Malaisse).

entre les kératinocytes des couches supérieures. Il s'agit de cellules productrices de mélanine et donc responsables de la pigmentation du tissu. En effet, dans le corps de ces cellules se trouvent des mélanosomes, organites spécialisés dans l'accumulation de la mélanine. Lors d'un stress UV, ces mélanosomes synthétisent davantage de mélanine et migrent dans les prolongements dendritiques pour transférer la mélanine qui va former un écran destiné à protéger le matériel génétique contenu dans les noyaux des kératinocytes environnants (Iyengar, 2013) (Goding, 2007).

Les *cellules de Langerhans* sont des cellules dérivées de la moelle osseuse. Ces cellules du système immunitaire migrent de la moelle osseuse jusqu'à l'épiderme par la circulation sanguine. Ces cellules sont principalement localisées entre les kératinocytes de la couche épineuse. Il s'agit de cellules dendritiques, capables de reconnaître des antigènes et de phagocyter des organismes étrangers. Faisant partie des cellules de l'immunité innée, celles-ci clivent le matériel endocyté et migrent dans les ganglions lymphatiques. À ce niveau, ces cellules dendritiques présentent les peptides immunogènes aux lymphocytes de manière à déclencher une réponse immunitaire spécifique (Berger, Vasquez, Shofner, Mariwalla, & Edelson, 2006).

Les *cellules de Merkel* sont des récepteurs sensoriels associées à des terminaisons nerveuses. Ces cellules sont situées au niveau de la couche basale de l'épiderme. Les cellules de Merkel font partie du système nerveux périphérique permettant la détection de divers stimuli externes. Ces cellules sont impliquées dans la détection des formes, des textures, des courbes et de façon plus générale, dans le toucher (Maricich et al., 2009) (Morrison, Miesegaes, Lumpkin, & Maricich, 2009).

Les *kératinocytes* représentent la population majoritaire du tissu. Ces cellules reposent sur la lame basale où elles prolifèrent abondamment. Elles évoluent ensuite vers les couches les plus superficielles de l'épiderme. Lors de cette migration, les kératinocytes vont subir des changements biochimiques menant à la desquamation de ceux-ci. Ce processus de différenciation, appelé kératinisation, se déroule sur une durée de 45 jours environ. Sur base des changements morphologiques des kératinocytes, 4 à 5 couches peuvent être distinguées : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche transitoire éventuelle et la couche cornée [figure 6] (Freinkel & Woodley, 2001).

Organisation tissulaire

La *couche basale* est la couche de cellules la plus profonde associée à la lame basale par des jonctions nommées hémidesmosomes (Hérin, 2012). Cette couche ne comprend qu'une seule assise cellulaire composée de cellules cubiques ou polyédriques. Cette couche basale est aussi appelée couche germinative de par le nombre de divisions cellulaires qui s'y déroulent (Watt, 1998). En effet, deux types de kératinocytes caractérisent la couche basale : des cellules souches, capables de se diviser lentement mais indéfiniment et des cellules d'amplification transitoire, capables de se diviser rapidement un certain nombre de fois avant d'entrer dans le processus irréversible de différenciation. Lorsque ces kératinocytes arrêtent de proliférer, ils perdent leur capacité d'adhésion à la lame basale et migrent vers les couches supra-basales (Barrandon & Green, 1987).

La *couche épineuse* est composée de kératinocytes polyédriques de grandes tailles. Cette couche est composée de 5 à 10 assises cellulaires. Le nom de couche « épineuse » provient des nombreux desmosomes qui forment les jonctions entre les filaments intermédiaires de kératine 1 et 10 des kératinocytes voisins (Freinkel & Woodley, 2001). C'est au niveau de

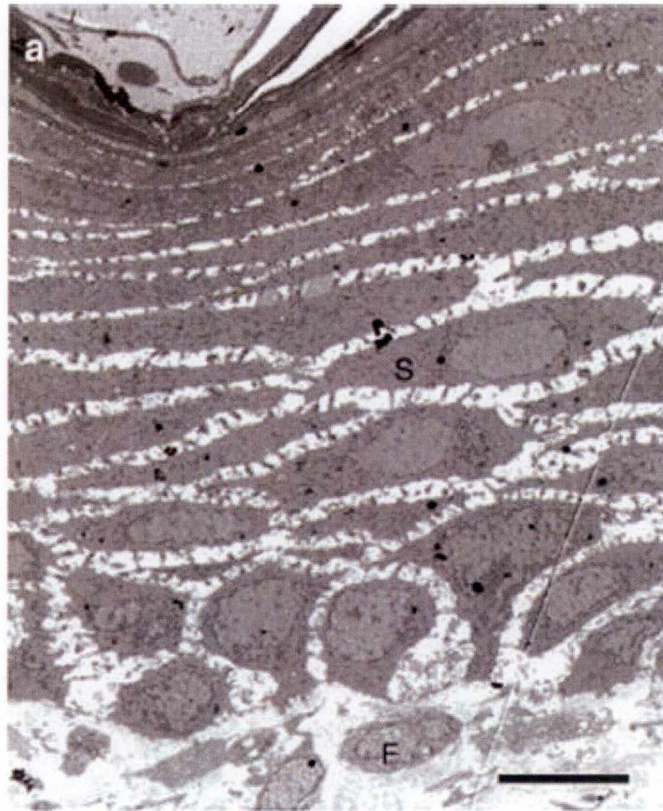


Figure 7 : Étude en microscopie électronique de la structure de l'épiderme. Observation d'une matrice extracellulaire entre les kératinocytes. Barre d'échelle = 10µm. (Biedermann, 2010)

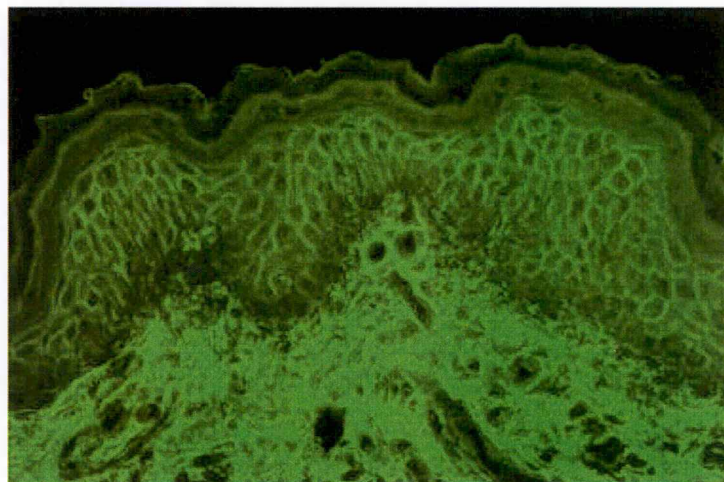


Figure 8 : Détection de l'acide hyaluronique dans le derme et l'épiderme d'une peau normale humaine (Malaisse, 2014).

L'HA est marqué au moyen d'une protéine d'aggreccan biotynilé. Une streptavidine verte reconnait et lie la biotine. L'acide hyaluronique apparait très concentré dans le derme mais celui-ci est également visible au niveau de la matrice extracellulaire des couches inférieures de l'épiderme.

cette couche que des petits organites tels que les corps d'Odland (corps lamellaires) apparaissent dans le cytoplasme des cellules (communication de Y. Poumay).

La *couche granuleuse* est composée de cellules pavimenteuses, c'est-à-dire des kératinocytes dont le cytoplasme est aplati. Cette couche est formée de 1 à 3 assise(s) cellulaire(s). Dans ces kératinocytes apparaissent des grains de kératohyaline et le noyau entre en pycnose. C'est à ce niveau que les corps lamellaires sécrétés par l'appareil de Golgi vont fusionner avec la membrane plasmique et déverser leur contenu en glycoprotéines, glycolipides, stérols et hydrolases acides dans la matrice extracellulaire. Ces lipides vont entourer les cellules cornées de manière à fermer les espaces intercellulaires par une barrière lipidique (Freinkel & Woodley, 2001).

Une *couche de transition* est parfois considérée entre la couche granuleuse et la couche cornée, particulièrement au niveau des épidermes palmo-plantaires. En effet, avant de passer au dernier stade de différenciation, les kératinocytes subissent plusieurs changements biochimiques. L'ADN ainsi que les organites sont lysés menant à des cellules semblables aux cellules en apoptose, mais où la caspase 14 joue un rôle essentiel (Eckhart et al., 2000).

La *couche cornée* est la dernière étape de la différenciation et est composée de cellules pavimenteuses mortes et anucléées appelées cornéocytes. Le nombre d'assises cellulaires de cette couche est fonction de la localisation. Le nombre de couches de cellules va de 15 au niveau de la peau du dos (épiderme nommé EPSK A) à une centaine au niveau de la paume des mains et la plante des pieds (épiderme nommé EPSK B). En plus de la lyse du noyau, les filaments intermédiaires présents dans le cytoplasme des cellules s'agrègent par l'action de la filaggrine (dont le précurseur est présent dans les grains de kératohyaline) et les protéines d'enveloppe forment une enveloppe de 7 à 15nm d'épaisseur. Les cornéocytes entourés par les lipides contenus dans les corps lamellaires forment une barrière étanche à l'instar des briques et du ciment d'un mur. Le maintien de l'homéostasie de cette barrière est directement dépendant du pH acide de la couche cornée. En effet, la formation des céramides est dépendante d'enzymes actives uniquement à pH acide (environ pH 5) (Elias et al., 2003). Les cornéocytes les plus superficiels finissent par desquamer et sont remplacés par les cellules des couches sous-jacentes en différenciation (Freinkel & Woodley, 2001). À nouveau, le maintien du pH acide permet une desquamation finement régulée. En effet, les sérines protéases vont dégrader les cornéodesmosomes et permettre la desquamation des cornéocytes à une vitesse appropriée par rapport au renouvellement des cornéocytes (Elias et al., 2003).

Bien que les cellules des différentes couches de l'épiderme soient très proches les unes des autres et possèdent des jonctions, des espaces entre leurs membranes plasmiques sont tout de même observables. En effet, des études en microscopie électronique ont mis en évidence des espaces entre les kératinocytes adjacents de 15 à 20 nm. Une matrice extracellulaire est donc présente entre les cellules de l'épiderme [figure 7].

Localisation de l'acide hyaluronique

Bien que présent en majorité dans le derme, l'acide hyaluronique trouve aussi sa place dans l'épiderme [figure 8]. L'HA est en effet observable en grande quantité dans les couches basale et épineuse au niveau intercellulaire (Pasonen-seppinen et al., 2003). Cependant, de l'HA est également présent dans les cellules de la couche granuleuse et dans les cornéocytes (Sakai et al., 2000). Une hypothèse se base sur le modèle de Robert Stern selon lequel l'HA est clivé par Hyal2, internalisé par les récepteurs CD44 et ensuite fragmenté en disaccharides par Hyal1. Ces fragments d'HA présents dans les kératinocytes en différenciation seraient capables de migrer jusqu'à la couche cornée (Sakai et al., 2000) (Stern, 2004).

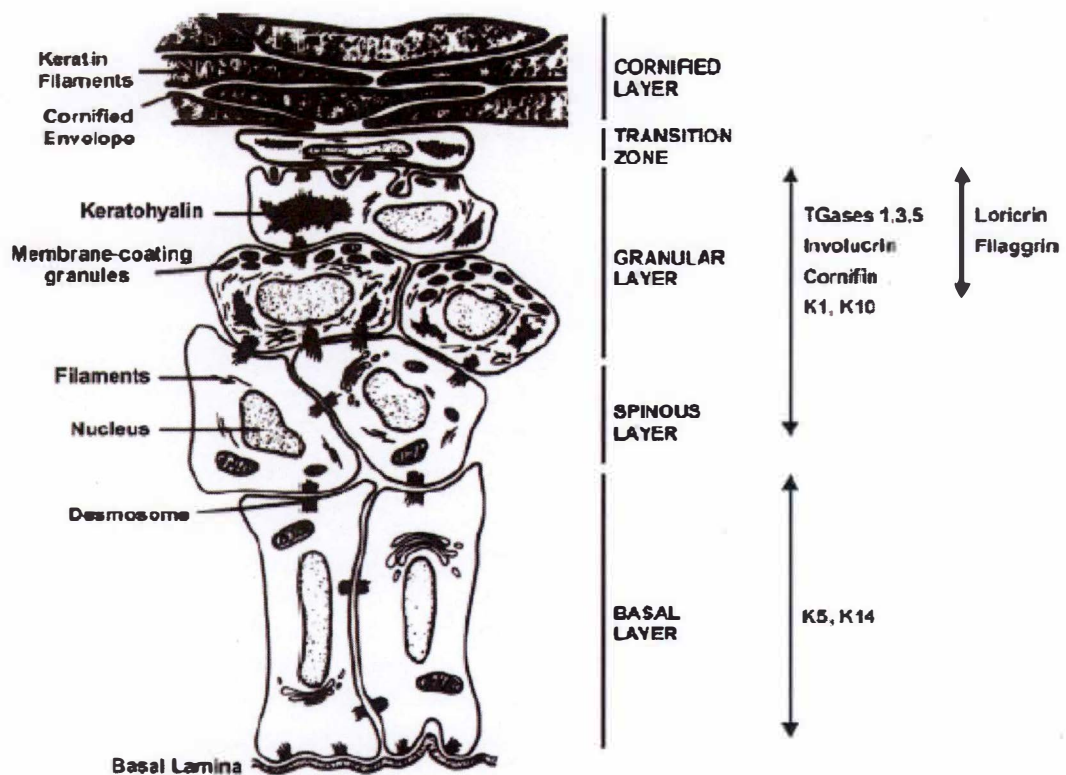


Figure 9 : Schématisation du processus de différenciation (Eckert, 2005)

Les kératines 5 et 14 sont des marqueurs basaux de la prolifération. Dans les couches supra-basales, l'expression de ces kératines est remplacée par l'expression des kératines 1 et 10. La transglutaminase et l'involucrine, en tant que marqueurs tardifs, sont également exprimés au niveau des couches supra-basales. La filaggrine et l'involucrine (marqueurs tardifs) sont exprimés à partir de la couche granuleuse.

2.3.2. Fonctions :

La peau est l'organe le plus exposé aux stimuli extérieurs. Elle est dès lors équipée pour 'répondre' à plusieurs types d'agression. Chaque cellule composant l'épiderme joue un rôle qui lui est propre. Les mélanocytes, en déversant leur contenu en mélanine lors d'un stress UV possèdent un rôle de protection du matériel génétique et évitent des dommages à l'ADN (Iyengar, 2013). Les cellules de Langerhans sont impliquées dans l'immunité innée et reconnaissent une large variété de pathogènes (Berger et al., 2006). Les cellules de Merkel quant à elles sont associées au nerveux périphérique et renseignent l'organisme sur les phénomènes qui concernent le toucher (Maricich et al., 2009). Enfin, les kératinocytes et plus particulièrement les cornéocytes, directement au contact avec l'environnement extérieur aérien chez l'homme, jouent un rôle de barrière. Les cornéocytes, cellules épaisses, en collaboration avec les lipides extracellulaires forment la barrière épidermique. En effet, ils empêchent les substances chimiques, physiques et biologiques ainsi que les pathogènes de pénétrer à l'intérieur de l'organisme. Simultanément, ils limitent la perte des liquides corporels (Proksch, Brandner, & Jensen, 2008).

2.3.3. Processus de différenciation :

Lors de la formation de l'épiderme, les kératinocytes passent par un stade de prolifération, limité à la couche basale, avant d'entamer le processus de kératinisation. Pour atteindre cette kératinisation, les cellules subissent une différenciation c'est-à-dire qu'elles subissent un ensemble de modifications de leur expression génique qui modifient leurs propriétés et qui mènent à la formation des cornéocytes. Durant ce processus, un certain nombre de protéines sont exprimées ou réprimées en fonction du stade de différenciation. Ces protéines font partie des 'marqueurs de différenciation', car leur expression permet notamment d'évaluer le stade de différenciation cellulaire lors d'études *in vivo* ou *in vitro*.

Certaines protéines sont exprimées de manière précoce, donc au début du phénomène de différenciation, puis leur expression diminue progressivement. À l'inverse, d'autres protéines ne sont exprimées que de manière tardive [figure 9].

Les kératinocytes possèdent dans leur cytoplasme un grand nombre de filaments intermédiaires. Les protéines associées à ces filaments dans les épithéliums sont les *kératines* et existent au nombre de 54. Les filaments intermédiaires participant à la formation des jonctions par l'intermédiaire des desmosomes (jonction cellule-cellule) et des hémidesmosomes (jonction lame basale-cellule), les kératines sont également impliquées dans l'intégrité de l'épiderme. Différentes paires de kératines sont exprimées lors de la différenciation des kératinocytes. Les kératines 5 et 14 (K5/K14) sont exprimées spécifiquement dans la couche basale et représentent donc un bon marqueur des cellules capables de prolifération, au même titre que les *intégrines*. Par contre, les kératines 1 et 10 (K1/K10) sont exprimées dans toutes les couches suprabasales (couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée) où elles « remplacent » la paire K5/K14 (Moll, Divo, & Langbein, 2008) (Minner et al., 2010).

D'autres protéines apparaissent plus tard au cours de la différenciation. La *transglutaminase 1* (TGM1) est une enzyme dépendante du calcium. Celle-ci apparaît dans la couche épineuse mais ne devient active que dans la couche cornée, lorsque la lyse de la cellule provoque l'entrée de calcium. La TGM1 active est impliquée dans la formation de ponts entre d'autres protéines, telles que l'involucrine (IVL), la filaggrine (FLG) et la loricrine (LOR) qui forment une enveloppe cornée imperméable (Eckert, Broome, Ruse, & Rorke, 2005).

L'*involucrine* est un marqueur exprimé à partir des couches granuleuses mais surtout impliqué dans la formation de l'enveloppe cornée. La *filaggrine* est le produit de la profilaggrine constituant les grains de kératohyaline. Tout comme l'involucrine, elle participe à la formation de l'enveloppe cornée mais elle joue aussi un rôle dans l'association des filaments intermédiaires lorsque les cellules meurent dans la couche cornée. Enfin, la *loricrine* apparaît dans la couche granuleuse mais est très fortement exprimée au niveau de la couche cornée. Enfermée dans des granules, sa libération est dépendante du calcium. Cette protéine est activement impliquée dans la formation de l'enveloppe cornée (Eckert et al., 2005).

Finalement, les kératinocytes devenus des cornéocytes desquament.

2.3.4. Rôles de l'acide hyaluronique dans l'épiderme :

En plus de son rôle d'hydratation et de maintien de l'élasticité de la peau, majoritairement dans le derme mais également dans l'épiderme, diverses fonctions de l'acide hyaluronique dans l'épiderme ont été mises en évidence :

Régulation de la prolifération des kératinocytes :

Comme mentionné précédemment, l'acide hyaluronique stimule des cascades de signalisation cellulaire induisant la migration et la prolifération des kératinocytes (Rilla, 2002).

Une étude récente menée par le laboratoire du chercheur Kirsi Rilla (Rilla, Pasonen-Seppänen, Rieppo, Tammi, & Tammi, 2004) a étudié l'effet du 4-méthylumbelliférone (4-MU), inhibiteur de la synthèse de l'acide hyaluronique, sur la prolifération des kératinocytes. Les résultats montrent qu'en présence de cet inhibiteur et par conséquent lorsque la concentration en acide hyaluronique est diminuée, les kératinocytes arrêtent de proliférer. Une diminution de la migration des kératinocytes suite à des modifications du cytosquelette a également été mise en évidence dans ces conditions.

En parallèle, une autre étude a montré que lorsque des kératinocytes de la couche basale sont traités avec de l'EGF (epidermal growth factor), une plus grande quantité d'acide hyaluronique est observée et une augmentation de la prolifération s'en suit (Pasonen-seppänen et al., 2003).

En conclusion, l'acide hyaluronique apparaît nécessaire à la prolifération des kératinocytes.

Régulation de la différenciation des kératinocytes :

En plus d'une régulation de la prolifération, l'acide hyaluronique a un rôle dans la régulation de la différenciation des kératinocytes.

Il a précédemment été précisé que le poids moléculaire des fragments d'acide hyaluronique influençait le type de réponse cellulaire. Dans une étude de 2011 (Farwick et al., 2011), il a été montré que les fragments d'HA de très bas poids moléculaire (<50 kDa) régulent fortement l'expression de plus de 100 gènes. Parmi ces gènes, la plupart sont impliqués dans des phénomènes de régulation et de cohésion des cellules. Par contre, les fragments d'HA de plus haut poids moléculaire, c'est-à-dire de 800 kDa environ régulent l'expression seulement d'une quarantaine de gènes.

Cette étude a mis en évidence l'implication des fragments d'acide hyaluronique dans l'expression de marqueurs de différenciation : une augmentation de la quantité des fragments

d'HA induit une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation, et notamment des protéines des jonctions *tight* (claudine, occludine).

Une autre étude a démontré que lors d'ajout d'HA, certains marqueurs de différenciation tels que l'involucrine, la profilaggrine et la kératine 10 étaient augmentés. Cet effet est dépendant de la présence du récepteur de l'HA de type CD44 (Bourguignon et al., 2006).

Ces deux études ont donc mis en évidence un effet d'induction de la différenciation par l'HA. À l'inverse, d'autres chercheurs ont mis en exergue un effet répresseur de l'HA sur la différenciation, ce qui crée un paradoxe devant être élucidé.

Une première étude est basée sur la formation d'un épiderme à partir de kératinocytes immortalisés de rat (Passi et al., 2004). Afin de tester l'implication de l'acide hyaluronique sur la différenciation de l'épiderme, une hyaluronidase exogène provenant de la bactérie *Streptomyces* (StrepH) a été incubée avec les kératinocytes. À pH 4, cette StrepH dégrade l'acide hyaluronique de manière très spécifique. Malgré la dégradation de l'HA, les cultures cellulaires expriment des marqueurs de différenciation précoces (comme la kératine 10) ou tardifs (comme la filaggrine). En conclusion, cette étude démontre que la présence de HA pourrait avoir un effet plutôt répresseur sur la différenciation de l'épiderme.

La même année, une autre étude basée sur l'utilisation de StrepH sur des épidermes de souris a amené des conclusions similaires (Maytin, Chung, & Seetharaman, 2004). En effet, la présence de StrepH dégrade l'acide hyaluronique de l'épiderme et réduit de 50% l'épaisseur de ce tissu. Cependant, en présence de cette hyaluronidase exogène, les cellules expriment plus fortement les marqueurs de différenciation kératine 10 et filaggrine. Une explication serait que les kératinocytes, suite à l'action de la StrepH, entrent en différenciation de manière précoce menant à la formation d'un épiderme plus fin.

Enfin, des recherches de notre laboratoire sont arrivées récemment à la conclusion que l'acide hyaluronique n'influencerait pas la différenciation (Malaisse et al., 2014).

En effet, l'effet d'une hyaluronidase exogène (StrepH) ainsi que l'effet du 4-methylumbellifère (4-MU) ont été testés sur des monocouches de kératinocytes humains. Dans les deux cas, la quantité d'HA est diminuée ; par dégradation de celui-ci (StrepH) ou par inhibition de sa synthèse (4-MU). Quelle que soit la méthode utilisée, l'HA est diminué et pourtant aucun effet n'est observé sur l'expression des marqueurs de différenciation (kératine 10, involucrine et filaggrine). Cette étude mène à la conclusion que l'acide hyaluronique et la différenciation ne se contrôlent pas mutuellement.

En résumé, le rôle de l'acide hyaluronique dans le processus de différenciation de l'épiderme n'est pas encore clair et reste sujet à discussion.

Polarisation de la sécrétion des corps lamellaires :

Une des étapes du processus de différenciation-kératinisation des kératinocytes consiste à libérer des lipides dans la matrice extracellulaire au niveau des couches granuleuses supérieures. Ces lipides formant le ciment entre les cornéocytes sont sécrétés lors de la fusion des membranes des corps lamellaires et des membranes plasmiques des kératinocytes. Le but étant de former une barrière étanche en surface de l'épiderme, la sécrétion de ces lipides a lieu du côté apical des cellules granuleuses. Lorsque la synthèse de ces lipides est altérée, la barrière apparaît également perturbée (Elias et al., 2003) (Madison, 2003).

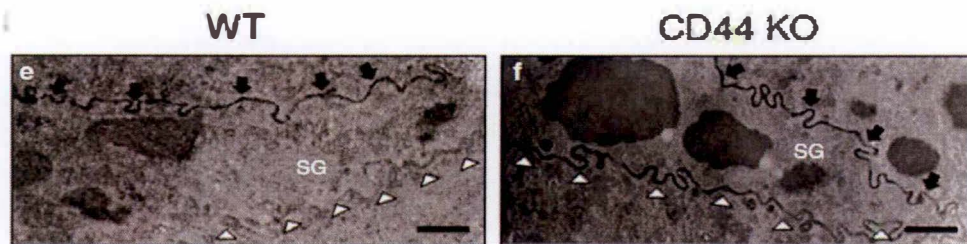


Figure 10 : Étude de la polarisation de la sécrétion des corps lamellaires en microscopie électronique (Bourguignon, 2006)

Au niveau de l'épiderme d'une souris sauvage (WT), les corps lamellaires sont sécrétés à la face apicale des kératinocytes de la couche granuleuse (SG). En revanche, au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme de souris déficientes en CD44 (CD44 KO), les corps lamellaires sont également sécrétés au niveau baso-latéral. Barre d'échelle = 0,5 μ m

L'acide hyaluronique intervient également dans la formation et la polarisation de la sécrétion des corps lamellaires, impliqués dans l'homéostasie de la barrière. La formation et la sécrétion des corps lamellaires dans les kératinocytes épidermiques sont directement dépendantes de l'interaction entre l'HA et son récepteur cellulaire CD44. Lorsque le récepteur CD44 est absent (expérience réalisée sur des souris CD44-déficientes), d'une part, la sécrétion des lipides contenus dans les corps lamellaires a lieu au niveau apical des kératinocytes mais aussi au niveau baso-latéral [figure 10] et, d'autre part, la synthèse du cholestérol médiée par l'HA est bloquée. Par contre, lors de l'ajout d'HA exogène, la quantité de corps lamellaires présents dans les kératinocytes de la couche granuleuse augmente, démontrant une stimulation de la formation des corps lamellaires par la présence d'acide hyaluronique (Bourguignon et al., 2006).

Ces défauts dans la formation et la sécrétion des corps lamellaires mènent à un épiderme fin et un délai dans la récupération de la barrière lors d'une blessure.

Contrôle du métabolisme de l'acide hyaluronique :

Bien que plusieurs laboratoires étudient les rôles de l'acide hyaluronique dans les épidermes, les mécanismes de contrôle du métabolisme de l'HA ne sont pas encore bien connus. C'est dans ce contexte que notre laboratoire investigate les influences de l'acide hyaluronique sur les kératinocytes.

Durant le processus de différenciation des kératinocytes, il a été observé que lorsque l'expression en ARNm de la HA synthase 1 augmente, la concentration en acide hyaluronique est également exacerbée. En effet, l'enzyme HAS1 apparaît dans ce cas être la synthase la plus impliquée dans les kératinocytes en conditions physiologiques (Malaisse et al., 2014).

Ces résultats concernent la production de l'acide hyaluronique. Cependant, une dégradation de celui-ci est essentielle afin de maintenir des niveaux équilibrés et physiologiques en acide hyaluronique dans la peau. La hyaluronidase 1 (Hyal1) joue un rôle dans la dégradation de l'HA. Néanmoins son rôle de dégradation au sein de l'épiderme n'est pas encore bien connu.

Cet enzyme a cependant été étudié dans des phénomènes pathologiques tels que l'exposition de la peau au rayonnement ultra-violet. La peau représente le premier organe en contact avec les stress extérieurs et notamment le rayonnement ultra-violet. Les rayons ultra-violets de type B (UV-B) sont absorbés par les premières couches de la peau, c'est-à-dire par l'épiderme et y causent des dommages aux kératinocytes. Dès lors, les effets et les variations d'expression des ARNm de l'enzyme de dégradation Hyal1 dans les kératinocytes ont été observés après irradiation avec des UV-B. Trois heures après une exposition aux UV-B, l'expression des ARNm de Hyal1 est augmentée et diminue ensuite pendant les 12 à 24h suivantes. Cela signifie que lors d'une exposition de la peau aux UV-B, l'expression de Hyal1 augmente, provoquant le clivage des molécules d'acide hyaluronique en une multitude de fragments d'HA de bas poids moléculaires. Ces fragments, potentiellement pro-inflammatoires, induisent des perturbations de l'homéostasie de l'épiderme (Kurdykowski et al., 2011).

Cela met bien en évidence l'implication probable de la hyaluronidase 1 dans des conditions pathologiques comme l'inflammation. Cependant, le rôle exact de la dégradation de l'acide hyaluronique dans des circonstances physiologiques normales n'est pas encore identifié.

3. Premières connaissances sur HYAL1 dans l'épiderme :

3.1. Modèle de culture des kératinocytes :

Afin d'étudier la physiologie de l'épiderme et les diverses protéines et enzymes qui y interagissent, la culture cellulaire est apparue une technique intéressante. Possédant les avantages de l'utilisation de cellules *in vitro* mais tout en conservant un modèle proche de l'*in vivo*, un grand nombre de chercheurs ont tenté de développer des modèles de culture des kératinocytes.

La difficulté de la culture des kératinocytes repose sur la capacité de certaines cellules à proliférer et d'autres cellules à se différencier en plusieurs couches pour former un organe complexe en trois dimensions : l'épiderme. Ces cellules différentes existent donc simultanément pour un même organe à des stades de différenciation différents, impliquant des caractéristiques biochimiques et morphologiques différentes.

La première étape menant au développement de cultures cellulaires fut l'isolement des kératinocytes de l'épiderme. C'est en 1975 que la première culture cellulaire de kératinocytes a été proposée (Rheinwald & Green, 1975). Dans cette méthode, les kératinocytes isolés sont ensemencés sur une couche de fibroblastes 3T3 irradiés. Ces fibroblastes, incapables de proliférer, apportent aux kératinocytes les éléments stimulants dont ils ont besoin et ce système permet la formation de colonies sur base des kératinocytes isolés. Cependant, le modèle montre des anomalies, notamment au niveau du processus de différenciation. En effet, les kératines 1 et 10, normalement exprimées dans les tissus *in vivo*, sont réprimées dans ce modèle. Une explication émise est la présence de fibroblastes et de sérum de veau fœtal dont les facteurs générés ne sont pas contrôlés.

Dès lors, un deuxième modèle a été proposé dès les années 80 (Boyce & Ham, 1983). Ce modèle se base sur le milieu MCDB 153, exempt de fibroblastes et de sérum de veau fœtal, mais enrichi en facteurs de croissance épidermique (EGF), d'insuline, d'extrait pituitaire bovin et appauvri en ions calcium. La culture cellulaire contient donc toujours des facteurs non contrôlés. Cependant, un point positif de cette culture est qu'elle fait intervenir une faible concentration de calcium, directement responsable de la non-stratification et de la différenciation des cellules apparaissant à partir de la confluence cellulaire (Y Poumay & Pittelkow, 1995).

Une dizaine d'années plus tard, la culture des kératinocytes est améliorée par la découverte de la culture autocrine. Lorsque les cellules atteignent un certain degré de confluence (>50%), celles-ci commencent à sécréter leurs propres facteurs de croissance et sont alors capables d'auto-prolifération (Cook, Pittelkow, & Shipley, 1991). Le gros avantage de ce modèle est qu'il ne nécessite pas l'utilisation de sérum de veau ou d'extraits pituitaires bovins, permettant donc une culture dans un environnement contrôlé.

Ce modèle est à la base du modèle de « culture en monocouche » autocrine. Les kératinocytes prolifèrent jusqu'à atteindre la confluence. À ce stade, la prolifération est inhibée et les cellules entrent dans le processus de différenciation terminale dont elles expriment les marqueurs (Minner et al., 2010).

Dans le but d'utiliser un modèle qui serait le plus proche possible d'un tissu *in vivo*, des cultures de kératinocytes en trois dimensions ont également été développées. Ce modèle permet de reconstituer un épiderme à partir de kératinocytes et de recréer les différentes

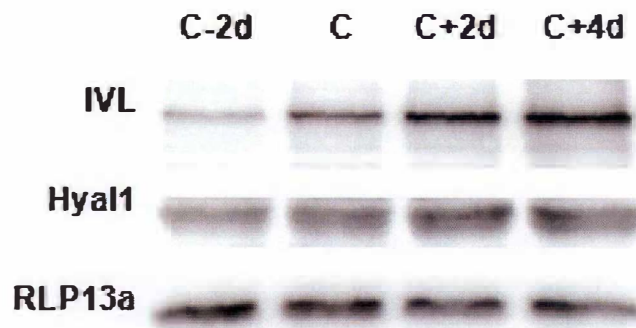


Figure 11 : Étude de l'abondance protéique de Hyal1 et de l'involucrine à différents stades de confluence (Damien Feret, mémoire 2013)

Les protéines des kératinocytes ont été extraites et déposées sur un gel d'électrophorèse. Soumises à un courant électrique, les protéines des kératinocytes ont été séparées en fonction de leur poids moléculaire respectif. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane pour être ensuite identifiées par incubation avec des anticorps spécifiques.

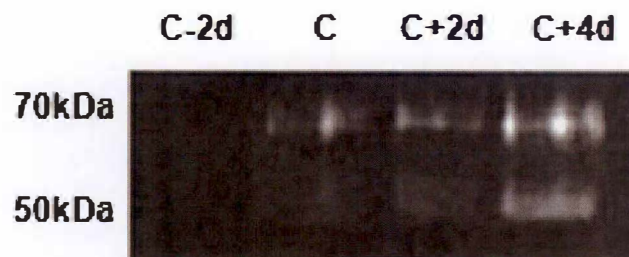


Figure 12 : Étude de l'activité enzymatique de Hyal1 à différents stades de confluence (Damien Feret, mémoire 2013)

Les protéines extraites aux mêmes stades de confluence que précédemment (C-2, C, C+2, C+4) ont été séparées selon leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide contenant de l'acide hyaluronique. Après incubation du gel au pH optimum de Hyal1 (pH 3,7), l'acide hyaluronique présent dans le gel au niveau des poids moléculaires de l'enzyme a été digéré avant d'être rendu visible par contre-coloration dans le reste du gel. Cette technique permet la révélation effective de l'activité de Hyal1

couches de cet épiderme, de la couche basale à la couche cornée. Pour ce faire, les kératinocytes sont ensemencés sur un filtre de polycarbonate sur lequel ils prolifèrent avant d'entamer leur processus de différenciation et de stratification. Les cellules de la couche basale, posées sur le filtre de polycarbonate se trouvent au contact d'un milieu enrichi en EGF, insuline, vitamine C et ions calcium. Une interface air-liquide est réalisée de manière à stimuler l'expression des marqueurs de différenciation tels que la profilaggrine. Onze jours sont nécessaires pour obtenir un équivalent d'épiderme humain totalement reconstruit *in vitro* (Frankart et al., 2012) (Poumay & Coquette, 2007) (Marcoux & Coquette, 2004).

C'est sur ces deux derniers modèles, culture en monocouche autocrine et épiderme reconstruit en 3D, que se base notre projet de recherche.

3.2. Expression et activité de HYAL1 :

Le but du projet étant d'étudier la fonction de Hyal1 dans l'épiderme, l'expression et l'activité de cette enzyme ont tout d'abord été caractérisées par Jérémy Malaisse dans le contexte de sa thèse et par Damien Feret lors de son mémoire.

Premièrement, le modèle de culture en monocouche a été utilisé, permettant une prolifération des kératinocytes. À partir du stade de confluence, les cellules entrent dans ce cas en différenciation et expriment divers marqueurs de différenciation. Le modèle d'étude étant basé sur la confluence, différents degrés de confluence sont analysés : 2 jours avant la confluence (C-2) où les cellules sont en prolifération, à confluence (C) où les kératinocytes arrêtent de proliférer, 2 jours après la confluence (C+2) et 4 jours après la confluence (C+4) où les cellules se différencient et expriment les marqueurs de ce processus.

Sur base de ces cultures, les protéines des kératinocytes ont été extraites et analysées par western blot. Trois protéines ont été analysées : Hyal1, l'involucrine (marqueur tardif de différenciation) et l'actine (contrôle de charge) [figure 11].

L'analyse de l'abondance protéique de l'involucrine a montré une augmentation progressive aux différents stades de confluence avec un maximum à C+4. L'involucrine étant un marqueur tardif de la différenciation, ce résultat est apparu comme cohérent. Quant à l'abondance de Hyal1, celle-ci semble très faible dans les premiers stades (C-2, C, C+2) mais apparaît en grande quantité à C+4 et donc dans des stades plus tardifs de la différenciation.

Bien que présente dans les kératinocytes en différenciation avancée, l'activité de Hyal1 a aussi été démontrée dans ces cultures. Dans ce but, les protéines ont été extraites aux mêmes stades de confluence que précédemment (C-2, C, C+2, C+4). L'activité de Hyal1 a été mise en évidence par zymographie [figure 12].

Comme pour l'abondance protéique, Hyal1 n'est presque pas active à C-2 et son activité augmente graduellement avec la confluence et par extension avec la différenciation, pour arriver à un maximum d'activité 4 jours après la confluence. De plus, Hyal1 apparaît active à 55kDa, mais aussi à 70kDa.

Ces résultats sont cohérents avec l'abondance protéique de Hyal1. Ceci a mis en évidence la présence mais aussi l'activité de Hyal1 dans des stades de différenciation avancés des kératinocytes. Cependant, ce modèle de culture était limité et le stade exact de différenciation dans lequel Hyal1 était présent et actif n'a pu être totalement défini.

Dès lors la reconstruction d'épidermes humains en trois dimensions a été utilisée permettant l'étude de l'expression des marqueurs de différenciation dans les diverses couches.

Les épidermes reconstruits ont été analysés après 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours de reconstruction, de manière à observer l'évolution de Hyal1 lors de la reconstruction. La détection spécifique de l'acide hyaluronique et de Hyal1 a été réalisée aux différents stades de reconstruction.

Hyal1 apparait spécifiquement localisé dans la couche granuleuse de l'épiderme alors que l'acide hyaluronique est présent dans les couches inférieures, à savoir la couche basale et la couche épineuse. Il est important de noter qu'aucune co-localisation n'existe entre l'HA et Hyal1.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus *in vivo* sur des peaux normales humaines. En effet, Hyal1 apparait localisé exclusivement dans la couche granuleuse sans aucune co-localisation avec l'acide hyaluronique présent dans les couches inférieures. Au vu de ces résultats, tant *in vitro* qu'*in vivo*, l'acide hyaluronique semble être clivé par Hyal1 au niveau de la couche granuleuse.

1. Objectifs du mémoire :

C'est dans ce contexte que notre projet prend place. Dans le but de comprendre pourquoi l'acide hyaluronique est dégradé dans les couches supérieures de l'épiderme, les **effets d'une déficience en Hyal1 sur la physiologie des épidermes** ont été étudiés.

En effet, pour étudier les effets d'une enzyme, deux stratégies d'approches sont possibles : soit l'enzyme est surexprimée, soit elle est inhibée. Dans le cadre de ce projet, c'est l'inhibition de l'enzyme qui a été choisie. En effet, cette méthode est apparue plus accessible étant donné l'existence d'une souris *knockout* pour Hyal1 et la maîtrise des méthodes d'inhibition stable d'un gène dans les kératinocytes au sein de notre laboratoire.

Dans le but d'avoir des résultats pertinents, deux modèles sont utilisés : le modèle *in vivo*, basé sur l'utilisation de souris et le modèle *in vitro*, qui vise à reconstruire des épidermes humains déficients en Hyal1. Le modèle *in vivo* consiste à comparer la peau de souris *wild-type* avec la peau de souris *knock-out* c'est-à-dire n'exprimant pas Hyal1. Plusieurs paramètres tels que la morphologie, la localisation des marqueurs de différenciation, la quantité d'acide hyaluronique présente dans la couche cornée ou encore la formation temporelle de la barrière épidermique ont été étudiés. Le modèle *in vitro*, basé sur la reconstruction d'épidermes à partir de kératinocytes humains se rapproche d'un épiderme humain complètement différencié. Ce modèle permet de comparer la localisation de l'acide hyaluronique, des marqueurs de différenciation ainsi que des capacités de prolifération d'un épiderme reconstruit normal par rapport à un épiderme reconstruit rendu déficient en Hyal1 (Malaisse et al., 2014).

L'étude de Hyal1 peut, *in fine*, mener à une meilleure compréhension des fonctions de l'acide hyaluronique dans l'épiderme.

MATÉRIEL & MÉTHODES

A. IN VITRO

1. Culture de kératinocytes humains [Tableau 1]

1.1. Culture primaire

Les kératinocytes humains sont isolés à partir de peaux abdominales prélevées chez des adultes ayant subi une abdominoplastie (par le Dr Bienfait de la clinique Saint Luc à Bouge). Cette opération est réalisée après avoir obtenu le consentement éclairé du patient ainsi que l'accord de la commission d'éthique de la clinique St Luc. Les échantillons de peaux sont traités par le chirurgien au moyen d'un dermatome pour en réduire l'épaisseur et ensuite conservés dans une solution physiologique à 4°C.

Les manipulations suivantes sont systématiquement réalisées sous hotte à flux laminaire permettant de travailler en conditions considérées stériles. Dans cet environnement, les échantillons de peau sont placés dans des boîtes en plastique contenant de la solution A et sont coupés en morceaux de 2cm² environ à l'aide d'un scalpel. Ces morceaux de peau sont alors transférés, avec la couche cornée exposée vers le haut, dans des boîtes en plastique contenant de la trypsine T17 ainsi que des anti-fongiques et antibiotiques. Après une incubation (Thermo Scientific, Rockford, USA) à 4°C pendant une nuit, l'épiderme est séparé du derme à l'aide de fines pinces. L'épiderme est déposé dans une nouvelle boîte en plastique contenant, cette fois, du KGM-2 + dFCS 2%. Les épidermes sont ensuite « triturés » avec des pinces et la suspension cellulaire est passée à plusieurs reprises dans une pipette de manière à dissocier les cellules. L'ensemble de la suspension est alors filtré sur un tamis (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) permettant la séparation des cellules épidermiques et de la couche cornée restée compacte. Le filtrat est centrifugé (10 minutes à 1000rpm à 4°C) et le culot est resuspendu dans du milieu KGM-2.

Les cellules sont ensuiteensemencées à une densité de 7000 cellules/cm² dans une flasque T175 (Cellstar, Frickenhausen, Allemagne) (175cm²) avec du KGM-2 + dFCS 2% et sont mises dans l'incubateur maintenu à une température constante de 37°C et une pression partielle en CO₂ de 5%. Après trois jours, le milieu est renouvelé et ensuite changé tous les deux jours jusqu'à atteindre 50-60% de confluence.

1.2. Culture secondaire

Lorsque les cellules atteignent entre 50 et 60% de confluence, le nombre de kératinocytes prolifératifs est amplifié par la culture secondaire. Il est important de ne pas atteindre le stade de confluence, stade à partir duquel les kératinocytes perdent leurs capacités prolifératives et entrent dans un processus de différenciation.

Le milieu présent dans la flasque est remplacé successivement par 5ml puis 2ml de trypsine T25. La première incubation de 5 minutes dans la trypsine permet de détacher et d'éliminer la plus grande partie des fibroblastes et mélanocytes. La deuxième incubation de 5 minutes dans la trypsine est suivie du détachement des kératinocytes du fond de la flasque en frappant énergiquement sur les bords de celle-ci. Après vérification du détachement des cellules au microscope, l'action de la trypsine est stoppée en ajoutant 10ml de solution bloquante dans la flasque. La suspension cellulaire est alors récupérée et déposée dans un tube (Corning, Centristar, Mexico, USA) de 50ml. Après la centrifugation (Allegra X-15R Centrifuge) de celui-ci (pendant 5 minutes, 1000rpm, à 4°C), le surnageant est aspiré et le culot est resuspendu dans 10ml de milieu Epilife supplémenté. Les cellules sont comptées et ensemencées dans une nouvelle flasque T175 avec une densité de 10 000 cellules par cm². Le milieu est renouvelé tous les deux jours jusqu'à atteindre près de 60% de densité cellulaire.

Composition	Concentration	Firme
Milieu KBM-2 (keratinocyte basal medium)		Clonetics, Verviers, BE
Milieu KGM-2 (keratinocyte growth medium) :		Clonetics, Verviers, BE
BPE (Bovine Pituitary Extracts)	50µg/ml	
EGF (Epithelial growth factor)	10 ng/ml	
Hydrocortisone	0.18 µg/ml	
Insuline	5µg/ml	
Transferrine	5µg/ml	
Antibiotiques :		
○ Fongizone	250µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
○ Gentamycine	50mg/ml	BioWittaker, Maryland, USA
○ Ampicilline	250µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Milieu de culture Epi avec compléments :		
Milieu Epilife		Life Technologies, New York, USA
HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement) :		Life Technologies, New York, USA
BPE (Bovine Pituitary Extracts)	0.2%	
EGF (Epithelial growth factor)	0.2 ng/ml	
Hydrocortisone	0.18 µg/ml	
Insuline	5µg/ml	
Transferrine	5µg/ml	
Antibiotiques:		
○ Pénicilline	50U/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
○ Streptomycine	50µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Milieu de culture Epi sans complément :		
Milieu Epilife		Life Technologies, New York, USA
Hydrocortisone	0.18 µg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Acides aminés		Sigma-Aldrich, Missouri, USA
○ L-histidine	1.677g	
○ L-isoleucine	3.280g	
○ L-methionine	0.448g	
○ L-tryptophan	0.306g	
○ L-tyrosine	0.453g	
Antibiotiques		Sigma-Aldrich, Missouri, USA
○ Pénicilline	50U/ml	
○ Streptomycine	50µg/ml	
Stérilisation par filtre Stérivex-GP (0,22 µm)		Millipore, Bruxelles, Belgique
Solution A :		

À ce moment-là, les cellules sont à nouveau détachées de la boîte par action de la trypsine T25, transférées dans la solution bloquante, centrifugées (pendant 5 minutes, 1000rpm, à 4°C), comptées et resuspendues dans du milieu Epilife supplémenté. Les kératinocytes sont ensuite congelés dans des cryotubes à une densité de 1 000 000 cellules par millilitre dans la solution de congélation. Ces tubes sont placés à -80°C pendant un minimum de 48h puis dans l'azote liquide à -180°C pour une plus longue conservation.

Ces kératinocytes conservés dans les cryotubes sont référencés sous le nom de NAK (Normal Abdominal Kératinocyte) et correspondent à une souche cellulaire provenant d'une abdominoplastie (Minner et al, 2010).

1.3. Culture tertiaire

Un cryotube contenant des kératinocytes de la culture secondaire est décongelé et la suspension cellulaire est déposée dans une flasque T175 en présence de 25ml de KGM-2 (permettant aux cellules d'adhérer à la boîte). Après 24h d'incubation à 37°C, le milieu présent est remplacé par du milieu Epilife complémenté (permettant la croissance et la prolifération des cellules). Ce milieu est renouvelé tous les deux jours jusqu'à atteindre 60-70% de densité cellulaire. À ce stade, le milieu présent dans la flasque est remplacé successivement par 5ml puis 2ml de trypsine T25 (incubation de toutes deux 5 minutes) permettant le détachement des kératinocytes du fond de la flasque en frappant énergiquement sur les bords de celle-ci. Après vérification du détachement des cellules au microscope, l'action de la trypsine est stoppée en ajoutant 10ml de solution bloquante dans la flasque. L'ensemble de la suspension cellulaire est alors récupérée et déposée dans un tube de 50ml contenant au total 25ml de solution bloquante. Après la centrifugation de celui-ci (pendant 5 minutes, 1000rpm, à 4°C), le surnageant est aspiré, le culot est resuspendu dans quelques millilitres d'Epilife complémenté et le nombre de cellules est calculé.

1.3.1. Monocouche

Les kératinocytes sont ensuiteensemencés dans du milieu Epilife complémenté à une densité de 7500 cellules/cm² dans des boîtes de culture de 3cm de diamètre. Ces boîtes sont placées à l'incubateur. À nouveau, le milieu est renouvelé tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 50% de densité cellulaire, le milieu Epilife complémenté est aspiré, les boîtes sont rincées deux fois par de la solution A avant d'être remplacé par un milieu Epilife décomplémenté obligeant les cellules à produire leurs propres facteurs de croissance. Lorsque les kératinocytes atteignent la confluence, ils perdent leur pouvoir prolifératif et entrent en différenciation (Minner et al, 2010).

1.3.2. Épiderme reconstruit

Les kératinocytes sontensemencés sur des inserts (composés d'un filtre de polycarbonate) disposés dans les puits des plaques 6 puits. Les kératinocytes sont resuspendus dans du milieu Epilife complémenté par du calcium et sontensemencés à une densité de 150 000 cellules par insert. Du milieu Epilife complémenté avec du calcium est également disposé dans le puits, autour de l'insert. Après 24h dans l'incubateur, les kératinocytes ayant adhéré au filtre de polycarbonate, le milieu se trouvant dans l'insert est délicatement aspiré de manière à créer l'interface air-liquide. D'autre part, le milieu entourant l'insert est changé par l'Epilife complémenté avec calcium, KGF et vitamine C et renouvelé tous les deux jours. Dès lors, les nutriments et facteurs sont apportés aux cellules par diffusion au travers du filtre de polycarbonate. Une fois l'interface air-liquide réalisé, l'épiderme va se reconstruire pendant 11 jours jusqu'à constituer des différentes couches caractéristiques d'un épiderme *in vivo* (Frankart et al., 2012).

pH 7,2-7,4 Stérilisation par filtre Stérivex-GP (0,22 µm)		Millipore, Bruxelles, Belgique
Glucose	10 mM	
KCl	2 mM	
NaCl	130 mM	
Na ₂ HPO ₄	1 mM	
Rouge phénol	0,0033 mM	
HEPES	30 mM	
Trypsine T17 :		
Solution A		
Trypsine (pour disruption des tissus épidermiques)	0.17%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Trypsine T25 :		
Solution A		
Trypsine (pour passage)	0.025%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétate)	0.01%	
Solution bloquante :		
Solution A		
dFCS (dialyzed fetal calf serum)	2%	Clonetics, Verviers, BE
Solution de congélation :		
Milieu Epilife	60%	Life Technologies, New York, USA
DMSO (dimethylsulfoxide)	20%	Merck, Darmstadt, Allemagne
dFCS (dialyzed fetal calf serum)	20%	Clonetics, Verviers, BE
Milieu de culture des RHE (Reconstructed Human Epidermis):		
Culture sur inserts en polycarbonate 0.63cm ²		Millipore, Billerica, MA, USA
Milieu Epilife complémenté		Life Technologies, New York, USA
Calcium	1.5mM	R&D Systems, Abingdon, UK
KGF (Keratinocyte Growth Factor)		R&D Systems, Abingdon, UK
Vitamine C	50µg/ml	R&D Systems, Abingdon, UK
Milieu de culture des monocouches :		
Culture sur boîtes 6 puits		Cellstar, Frickenhausen, Allemagne
Milieu Epilife complémenté		Life Technologies, New York, USA

Tableau 1: Matériel nécessaire à la culture de kératinocytes humains

2. Inhibition de l'expression ou de l'activité de HYAL1

2.1. Inhibition de l'expression de HYAL1 à l'aide de vecteurs lentiviraux [Tableau 2]

Le but de la manipulation est d'inhiber l'expression de HYAL1 de manière stable dans les kératinocytes. Cette inhibition stable passe par l'utilisation de particules virales contenant des shRNA qui ciblent l'ARNm du gène HYAL1 dans les kératinocytes humains. Les lentivirus sont des virus dérivés de l'HIV (virus de l'immunodéficience humaine) mais génétiquement modifiés de manière à ce qu'ils ne soient plus pathogènes. Cependant ils ont gardé leur capacité à infecter une cellule permettant de transduire de façon efficace des shRNA qui ciblent l'ARNm d'un gène en particulier.

L'infection des kératinocytes par les particules lentivirales a lieu lors de la culture tertiaire. Après avoir été trypsinisées et comptées, les cellules étaient précédemment ensemencées dans des boîtes (pour les monocouches) et sur inserts (pour les épidermes reconstruits). C'est à ce niveau de la manipulation que l'infection a lieu.

Les particules virales ainsi que la protamine sulfate sont ajoutées à la suspension cellulaire à raison de 10 particules virales pour 1 cellule. Le tout est ensuite ensemencé dans une flasque T75 (75cm²) avec le milieu Epilife complémenté. La flasque T75 est placée à l'incubateur pour une durée de 24h. Le lendemain, le milieu est remplacé par un milieu Epilife complémenté contenant de la puromycine 2µg/ml pour sélectionner les cellules ayant été infectées par les lentivirus. 24h plus tard, le milieu est changé par du milieu Epilife complémenté. Le milieu est renouvelé tous les deux jours jusqu'à atteindre 60-70% de confluence. À ce stade, les flasques sont trypsinisées comme lors de la culture tertiaire et les kératinocytes sont ensemencés pour former soit des monocouches, soit des épidermes reconstruits (Pendaries et al., 2014).

2.2. Inhibition de l'activité de HYAL1 à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique [Tableau 3]

L'Acide O-Palmitoyl L-Ascorbique est un dérivé de la vitamine C ayant des propriétés d'inhibiteur pharmacologique de HYAL1. Sous forme de poudre, l'OPAA est dilué dans du DMSO (0,04145µg/ml), un co-solvant permettant de solubiliser l'OPAA dans le milieu Epilife complémenté.

L'inactivation de HYAL1 par OPAA a lieu lors de la culture tertiaire sur monocouche. Lorsque les cellules atteignent le stade de confluence, 1, 5, 10, 25 ou 50µM d'OPAA dilués dans du DMSO sont mélangés à 10ml d'Epilife complémenté et 1.5ml de ce milieu est mis sur les monocouches de kératinocytes. Après 48h d'incubation, le milieu est retiré et les boîtes sont congelées à -80°C (Olgen et al, 2007).

3. Traitement des échantillons – mise en paraffine [Tableau 4]

Les échantillons d'épidermes reconstruits sont placés dans le fixateur pendant un minimum de 24h. Les échantillons sont ensuite inclus et enrobés en paraffine. La paraffine étant hydrophobe, les échantillons doivent être préalablement déshydratés par passage dans 4 bains successifs de méthanol, et passés dans des bains de toluol qui est un solvant de la paraffine et constitue donc un bon intermédiaire avant d'être plongés dans la paraffine à 60°C. L'inclusion en paraffine faite, l'enrobage prend place sur l'histocentre. Les échantillons sont placés dans

Composition	Concentration	Firme
Lentivirus maps		MISSION Lentiviral Transduction Particles, Sigma-Aldrich, Bornem, BE
5 types de shRNA : <ul style="list-style-type: none"> ○ Non-target (NT) $8,6 \times 10^8$ U/ml: shRNA qui ne possède pas de cible connue = contrôle ○ TRCN0000063649 $1,2 \times 10^9$ U/ml : shRNA qui cible la séquence codante du gène HYAL1 ○ TRCN0000063350 $1,0 \times 10^9$ U/ml : shRNA qui cible la séquence codante du gène HYAL1 ○ TRCN0000063648 $1,4 \times 10^7$ U/ml : shRNA qui cible la séquence codante du gène HYAL1 ○ TRCN0000372411 $1,3 \times 10^7$ U/ml : shRNA qui cible la séquence codante du gène HYAL1 		
Milieu Epilife complémenté		Life Technologies, New York, USA
Protamine sulfate		Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Puromycine	2 μ l/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Tableau 2 : Matériel nécessaire à l'inhibition de l'expression de HYAL1 à l'aide de vecteurs lentiviraux

Composition	Concentration	Firme
Acide O-Palmitoyl L-Ascorbic (OPAA)	414,5M	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Diméthylsulfoxyde (DMSO)		Merck, Darmstadt, Allemagne
Milieu Epilife complémenté		Life Technologies, New York, USA

Tableau 3 : Matériel nécessaire à l'inhibition de l'activité de HYAL1 à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique

Composition	Concentration	Firme
Fixateur (Acide-formaline/EtOH)	4% formaline 70% éthanol 5% acide acétique glaciale	
Histocentre		HistoStar, Thermo Scientific, Rockford, USA
Microtome		Leica RM2245, Wetzlar, Allemagne
Lame SuperFrost+		Thermo Scientific, Rockford, USA

Tableau 4 : Matériel nécessaire au traitement des échantillons et la mise en paraffine

un moule rempli de paraffine à 60°C avec un angle de 30° par rapport au bord du moule. Le moule est refroidi permettant une solidification de la paraffine.

Les blocs de paraffine sont dégrossis au microtome avant d'être coupé à une épaisseur de 6µm. Ces lamelles de paraffine contenant l'échantillon d'intérêt sont étalées sur des lames SuperFrost+.

4. Coloration topographique [Tableau 5]

Les lames peuvent dès lors être colorées : celles-ci passent dans des bains successifs de toluol, méthanol et eau courante avant d'être colorées par l'hémalum (colorant basique qui colore en bleu les noyaux), l'éosine (colorant acide qui colore en rouge les protéines) et le safran (qui colore en jaune les fibres conjonctives). Les lames sont rincées au toluol, méthanol et eau entre chaque bain de colorant. Les lames sont finalement montées au DPX.

Les morphologies et structures des différents échantillons peuvent être observées au microscope (Olympus AX70).

5. Marquage immunohistochimique [Tableau 6]

Les échantillons fixés sont traités comme au point 3.2 pour obtenir les échantillons étalés sur lames SuperFrost+. Les lames sont déparaffinées en passant dans des bains successifs de toluol (2x2.5 minutes), méthanol absolu (2x2.5 minutes), méthanol 70% (1x2.5 minutes) et blanchis 10 minutes à l'eau courante. En fonction de l'anticorps étudié (cf tableau 7), une étape de 20 minutes de démasquage dans du tampon citrate est requise. Les lames sont rincées au PBS 1x et incubées 3x2 minutes dans la glycine 0.1M pour éliminer les aldéhydes fonctionnels. Les lames rincées au PBS-BSA-triton sont suivies d'une incubation de 1h dans le PBS-BSA-triton. Le triton permet la perméabilisation des membranes. Durant cette heure d'incubation, les anticorps primaires [Tableau 7] sont dilués dans le PBS-BSA-triton. Après l'étape de saturation, les anticorps primaires sont incubés dans une chambre humide pendant 1h ou une nuit en fonction de l'anticorps étudié. Les lames sont rincées au PBS-BSA-Triton et incubées 1h dans une chambre humide placée à l'obscurité avec l'anticorps secondaire [Tableau 8]. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS-BSA-triton et incubées une dernière fois avec du Hoechst 33258 qui marque les noyaux. Après 15 minutes d'incubation dans l'obscurité, les lames sont à nouveau rincées au PBS-BSA-triton avant d'être montées au Mowiol et finalement observées au microscope à fluorescence AX70 ou confocal (Leica, Wetzlar, Allemagne).

6. Marquage fluorescent HA/HYAL1 et 2 [Tableau 9]

Les échantillons fixés sont traités comme au point 3.2 pour obtenir les échantillons étalés sur lames SuperFrost+. Les lames sont déparaffinées en passant dans des bains successifs de toluol (2x2.5 minutes), méthanol absolu (2x2.5 minutes), méthanol 70% (1x2.5 minutes) et blanchis 10 minutes à l'eau courante. Les lames sont rincées au PBS 1x et incubées 3x2 minutes dans la glycine 0.1M pour éliminer les aldéhydes fonctionnels. Les lames rincées au PBS-BSA-triton sont suivies d'une incubation de 1h dans le PBS-BSA-triton. Le triton permet la perméabilisation des membranes. Durant cette heure d'incubation, les anticorps sont préparés : l'HABP (biotinylé) et l'anticorps anti-HYAL1 (1D10) sont dilués dans le PBS-BSA-triton [Tableau 10]. L'HABP (Hyaluronic Acid Binding Protein) est une protéine qui se lie spécifiquement à l'HA. Après l'étape de saturation, les anticorps primaires sont incubés une nuit dans une chambre humide à 4°C. Le lendemain, les lames sont rincées au PBS-BSA-

Composition	Concentration	Firme
Bain de déparaffinage et de coloration (toluol – méthanol – eau – éosine – hémalum – safran)		Medizintechnik, Burgdorf, Allemagne
DPX		VWR International, Pennsylvanie, USA

Tableau 5 : Matériel nécessaire à la coloration topographique

Composition	Concentration	Firme
Bain de déparaffinage et de coloration		Medizintechnik, Burgdorf, Allemagne
PBS 1x <ul style="list-style-type: none"> ○ KCL ○ KH₂PO₄ ○ NaCl ○ Na₂HPO₄·2H₂O pH 7.2	2.7 mM 15 mM 140 mM 8.1 mM	Merck, Darmstadt, Allemagne Merck, Darmstadt, Allemagne VWR International, Pennsylvanie, USA Vel, Texas, USA
Tampon citrate		Merck, Darmstadt, Allemagne
Glycine	0.1M	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PBS – BSA 0.2% - Triton 0.02% X100		PAA laboratories GmbH, PAsching, Austria ; Merck, Darmstadt, Allemagne
Hoechst 33258 (1/100)		Molecular Probes, NY, USA
Mowiol		Sigma, Bornem, BE

Tableau 6 : Matériel nécessaire au marquage immuno-histologique

Anticorps	Dilution	Caractéristiques	Source	Firme
Anti-KRT14	1/50	1 jour	souris	Santa-Cruz, Carlifornia, USA
Anti-KRT10	1/100	1 jour	souris	Dako, Glostrp, Denmark
Anti-LOR	1/100	1 jour	lapin	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CLD1	1/50	2 jour / démasq.	lapin	Invitrogène, NY, USA
Anti-OCL	1/50	2 jour / démasq.	lapin	Invitrogène, NY, USA
Anti-ZO1	1/50	2 jour / démasq.	souris	Invitrogène, NY, USA

Tableau 7 : Anticorps primaires pour les marquages immuno-histologiques

Triton et incubées 1h dans une chambre humide placée à l'obscurité avec l'anticorps secondaire. La streptavidine va se lier spécifiquement à la biotine liée à l'HABP et l'anticorps anti-souris va reconnaître l'anticorps anti-HYAL1 [Tableau 11]. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS-BSA-triton et incubées une dernière fois avec du Hoechst 33258 qui marque les noyaux. Après 15 minutes d'incubation dans l'obscurité, les lames sont à nouveau rincées au PBS-BSA-triton avant d'être montées au Mowiol et finalement observées au microscope à fluorescence AX70 ou confocal (Leica, Wetzlar, Allemagne).

7. Étude des protéines d'épidermes reconstruits par Western-blot [Tableau 12]

7.1. Extraction et dosage protéique

Le filtre de polycarbonate est découpé à l'aide d'un scalpel et placé dans un tube à vis contenant du tampon de lyse avec le tissu épidermique dirigé vers l'intérieur du tube. Le tube est vortexé et placé dans un bain d'eau à ébullition pendant 5 minutes. Le filtre de polycarbonate est ensuite gratté avec une pointe, le tube est à nouveau vortexé et mis à ébullition pendant 2 minutes. Le tube est centrifugé (5 minutes, 10 000rpm, 4°C) ce qui entraîne une sédimentation du filtre de polycarbonate ainsi que des débris cellulaires et principalement de la couche cornée. Le surnageant, ne contenant plus que les kératinocytes, est transféré dans un nouveau tube à vis qui pourra être stocké à -20°C.

Le dosage des protéines contenues dans les épidermes reconstruits est réalisé au moyen du réactif de Pierce et mesuré par un spectrophotomètre. L'albumine (BSA à 20µg/µl) est utilisée comme standard : différentes concentrations (4, 2, 1, 0.5, 0.25µg/µl) sont utilisées pour réaliser une courbe d'étalonnage. 5µl d'échantillons et d'étalon BSA sont déposés en duplicat sur une plaque 96 puits et 75µl de solution de Pierce (contenant un anti-SDS) sont ajoutés. Après 5 à 10 minutes d'incubation de la plaque sur agitateur, les valeurs d'absorbance sont obtenues au spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 660nm. La courbe d'étalonnage est réalisée à partir des standards et les concentrations en protéines des différents échantillons peuvent être établies.

7.2. Western-blot

Le Western-blot est une méthode d'analyse des protéines. Cette analyse se déroule en plusieurs étapes. Après extraction des protéines d'un échantillon, celles-ci vont migrer sur un gel de polyacrylamide soumis à un courant électrique qui sépare les protéines en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge. La seconde étape consiste à les transférer sur une membrane mise en présence d'un anticorps primaire, suivi d'une incubation avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Finalement une solution de révélation permet de visualiser la présence des protéines d'intérêt à des poids moléculaires particulier.

Électrophorèse

Les gels de séparation suivis du gel de concentration [Tableau 13] sont délicatement déposés entre deux plaques en verre et surmontés par un 'peigne' permettant la formation des puits pour charger les échantillons. Lorsque les gels ont polymérisé, l'ensemble des plaques de verre et du gel sont placés sur un portoir constitué d'une borne + et d'une borne -, le tout dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse. 25µl d'échantillons dilués dans de l'eau et du tampon de charge ainsi que 3µl du marqueur de poids moléculaire sont déposés dans les différents puits. Le portoir et la cuve sont branchés à un générateur de courant permettant de maintenir 130V pendant 1h30.

Anticorps	Dilution	Source	Firme
Anti-souris Alexa 488	1/200	Chèvre	Life Technologies, NY, USA
Anti-lapin Alexa 488	1/500	Cheval	Life Technologies, NY, USA

Tableau 8 : Anticorps secondaires pour les marquages immuno-histologiques

Composition	Concentration	Firme
Bain de déparaffinage et de coloration		Medizintechnik, Burdorf, Allemagne
PBS 1x <ul style="list-style-type: none"> ○ KCL ○ KH₂PO₄ ○ NaCl ○ Na₂HPO₄·2H₂O pH 7.2	2.7 mM 15 mM 140 mM 8.1 mM	Merck, Darmstadt, Allemagne Merck, Darmstadt, Allemagne VWR International, Pennsylvanie, USA Vel, Texas, USA
Glycine	0.1M	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PBS – BSA 0.2% - Triton 0.02% X100		PAA laboratories GmbH, PAsching, Austria ; Merck, Darmstadt, Allemagne
Hoechst 33258 (1/100)		Molecular Probes, NY, USA
Mowiol		Sigma, Bornem, BE

Tableau 9 : Matériel nécessaire au marquage fluorescent HA/HYAL1 et 2

Anticorps	Dilution	Source	Firme
Anti-HYAL1	1/1000	1D10 souris	Santa-Cruz, California, USA
HABP	1/25	Aggrecan cartilage de cheval	Dr Tammi (Université de Kuopio, FI)

Tableau 10 : Anticorps primaires pour les marquages fluorescents HA/HYAL1 et 2

Anticorps	Dilution	Source	Firme
Anti-souris	1/500	Chèvre	Cell Signalling, Leiden, NL
Streptavidine peroxydase	1/500		Sigma, Bornem, BE

Tableau 11 : Anticorps secondaires pour les marquages fluorescents HA/HYAL1 et 2

Transfert

Le gel est transféré sur une membrane de polyvinylidene fluoride (GE Healthcare Biosciences, Diegem, BE). Pour ce faire, un montage en « sandwich » est réalisé. Une éponge est surmontée d'un papier Wattman, le gel d'électrophorèse est déposé par-dessus et lui-même surmonté de la membrane. Un nouveau papier Wattman et une éponge sont ajoutés. Le tout est refermé dans un dispositif et déposé dans une cuve remplie de tampon de transfert. Cette cuve est soumise à 100V pendant 1h30 à 4°C.

Immunodétection [Tableau 14]

Après le transfert, la membrane est récupérée et incubée dans une solution de lait 5% pour saturer les protéines et minimiser les interactions non-spécifiques. Après 1h, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire de RPL13a et maintenue à 4°C sous agitation pendant 1 nuit ou 1h à température ambiante. Le lendemain, la membrane est lavée trois fois au PBS-Tween et ensuite incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin pendant 1h sous agitation. L'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase-HRP qui émet de la lumière après incubation d'une minute dans la solution de révélation à l'abri de la lumière. La membrane et plus exactement les protéines révélées sont ensuite photographiées et analysées grâce au système ImageQuant Las4000mini (GE Healthcare Biosciences, Diegem, BE).

8. Étude de l'activité enzymatique par zymographie [Tableau 15]

8.1. Extraction des protéines des épidermes reconstruits

Le filtre de polycarbonate est découpé à l'aide d'un scalpel et placé dans un homogénéisateur à 4°C contenant du tampon sucrose avec le tissu épidermique dirigé vers l'intérieur du tube. Le filtre de polycarbonate est ensuite gratté en faisant des aller-retour avec la tige dans l'homogénéisateur afin de détacher les kératinocytes du filtre. Lorsque le filtre apparaît plus pâle, il est extrait de l'homogénéisateur et l'homogénat est transféré dans un tube et peut être stocké à -20°C.

Le dosage des protéines contenues dans les cellules des épidermes reconstruits est réalisé comme expliqué au point 7.1.2 mais sans ajout d'inhibiteur de SDS étant donné que le tampon sucrose ne possède pas de SDS.

8.2. Zymographie

La zymographie est une technique permettant l'analyse de l'activité enzymatique. Les protéines migrent sur un gel de polyacrylamide contenant 0.17mg/ml d'acide hyaluronique, substrat de base de l'enzyme Hyal1. Suite à la migration, les enzymes se situent à leur poids moléculaire. Le gel est ensuite incubé à 37°C et au pH optimal de Hyal1. Celle-ci, se trouvant dans les conditions physiologiques, devient active et dégrade l'HA. Une contre coloration permet alors de mettre en évidence les poids moléculaires auxquels Hyal1 est actif.

Les gels de séparation suivis du gel de concentration [Tableau 16] sont délicatement déposés entre deux plaques en verre et surmontés par un 'peigne' permettant la formation des puits pour charger les échantillons. Lorsque les gels ont polymérisés, ils sont placés dans une chambre froide pendant une nuit.

Le lendemain, l'ensemble des plaques de verre et du gel sont placés sur un portoir constitué d'une borne + et d'une borne -, le tout dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration. Cette cuve est elle-même placée dans un bac de glace afin de garder une

Composition	Concentration	Firme
Tampon de lyse : ○ Tris-HCl ○ SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ○ Glycérol ○ Bleu de bromophénol ○ DTT (dithiothreitol)	62.5mM 2% 8.7% 0.05% 0.2%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Kit de Pierce		Thermo Scientific, Rockford, USA
PBS-tween ○ Tween ○ NaCl ○ Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O ○ KCl ○ KH ₂ PO ₄	0.1% 137mM 8mM 2.7mM 1.5mM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA VWR Inter, Pennsylvanie, USA Vel, Texas, USA Merck, Darmstadt, Allemagne Merck, Darmstadt, Allemagne
Tampon d'électrophorèse ○ Tris Base ○ Glycine ○ SDS	25mM 192mM 0.1%	UCB, Bruxelles, Belgique Merck, Darmstadt, Allemagne Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tampon de transfert ○ Tris Base ○ Glycine ○ Méthanol	25mM 192mM 20%	UCB, Bruxelles, Belgique Merck, Darmstadt, Allemagne Thermo Fisher Sc, Waltham, USA
Solution de saturation ○ Tampon PBS/Tween20 ○ Lait Gloria (Nestlé) 5%		Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Solution de révélation ○ A ○ B	10ml 100µl	Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne

Tableau 12 : Matériel nécessaire à l'extraction des protéines et au Western Blot

Composition	Gel de séparation (12%)	Gel de concentration (12%)
Eau	3.12ml	4.48ml
Acrylamide-Bisacrylamide 40%	4.2ml	1 ml
Tris/HCl 1.5M/0.5M pH 8.8/6.8	2.5ml	1.9ml
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	100µl	75µl
APS (Persulfate d'Amonium)	100µl	38µl
TEMED (tétraméthyléthylènediamine)	10µl	7.5µl

Tableau 13 : Composition des gels de séparation et de concentration (Western Blot)

température basse et d'éviter de dénaturer les protéines. 16µl d'échantillons dilués dans de l'eau et du bleu alourdisant ainsi que 3µl du marqueur de poids moléculaire sont déposés dans les différents puits. Le portoir et la cuve sont branchés à un générateur de courant permettant de maintenir 80V pendant 30 minutes puis 120V pendant 1h, tout en gardant un ampérage à 30mA.

Après migration, le gel est démoulé, placé dans une boîte en plastique et incubé en présence de triton-X100 3% sous agitation pendant 2h. Le triton permet de restaurer la conformation 3D des protéines. Le triton est ensuite remplacé par une solution de formate 0.1M NaCl 0.1M pH 3.7 (pH d'activité de Hyal). Le gel incube dans cette solution pendant 2-3 jours dans un bain-marie à 37°C. Le gel est rincé à l'eau et mis en présence de solution pronase 0.1mg/ml dans Tris 20mM pH 8 à 37°C pendant 2h. Cette solution digère les protéines de manière à ce qu'il ne reste que les sucres. Le gel est à nouveau rincé à l'eau et incubé 30 minutes dans une solution de formamide 50%. Enfin, le formamide 50% est remplacé par le colorant stainsall pendant une nuit et à l'abri de la lumière. Une photo (Appareil photo Canon SX240HS) peut finalement être prise sur transilluminateur et l'analyse peut être réalisée.

9. Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR

9.1. Extraction d'ARN de cultures cellulaires

Les kératinocytes extraits [Tableau 17] des peaux de souris ou les kératinocytes obtenus en culture cellulaire sont stockés à -80°C de manière à garder les ARN les plus stables possible. L'ensemble de la manipulation se déroule donc à 4°C et dans des conditions RNase-free pour éviter une dégradation et une contamination de l'ARN.

Kit ROCHE

Du tampon de lyse est ajouté aux kératinocytes qui se solubilisent. Le lysat est ensuite transféré sur une colonne ROCHE munie de son tube collecteur. Une première centrifugation a lieu. La DNase est déposée sur les colonnes. Celles-ci sont ensuite lavées à plusieurs reprises avec des tampons de lavage (= méthanol) et centrifugées. La colonne est placée sur un nouvel eppendorf et un tampon d'élution (= eau RNase free) est ajoutée. Après centrifugation, la colonne est jetée et le tube contenant les échantillons conservés sur glace jusqu'au dosage de l'ARN. Une conservation à -80°C est préférable pour le long terme.

Kit QIAGEN

Dans le cas des inserts, les filtres de polycarbonate sont découpés avec un scalpel et déposés dans les puits d'une plaque 12 puits. Le tampon de lyse et le β-mercaptoéthanol sont ajoutés à chaque puits. Le filtre est gratté avec une pointe de manière à retirer la couche cornée et détacher les kératinocytes. Le lysat est ensuite transféré sur une colonne QIAshredder.

La colonne est centrifugée et jetée. De l'éthanol 70% est ajouté au lysat récupéré dans le tube collecteur et mélangé par up-and-down. Le mélange est transféré sur une colonne RNeasy qui est centrifugée. Les colonnes sont ensuite lavées à plusieurs reprises avec des tampons de lavage et centrifugées. La colonne est placée sur un nouvel eppendorf et un tampon d'élution (= eau RNase free) est ajoutée. Après centrifugation, la colonne est jetée et le tube contenant les échantillons conservés sur glace jusqu'au dosage de l'ARN. Une conservation à -80°C est préférable pour le long terme.

Anticorps primaire	Dilution	Source	Poids moléculaire	Type	Firme
RPL13a	1/1000	lapin	23kDa	Polyclonal	Cell Signalling, Leiden, NL
Hyal1	1/1000	souris	55kDa	Polyclonal	Santa-Cruz, California, USA
Anticorps secondaire	Dilution	Source	Firme		
Anti-lapin HRP	1/5000	Chèvre	Cell Signalling, Leiden, NL		
Anti-souris HRP	1/5000	Cheval	Cell Signalling, Leiden, NL		

Tableau 14 : Anticorps primaires et secondaires nécessaire pour le Western Blot

Composition	Concentration	Firme
Tampon sucrose <ul style="list-style-type: none"> ○ Sucrose ○ Imidazole ○ Inhibiteur de protéases 	0.25M 3mM pH 7.4	Merck, Darmstadt, Allemagne Complete, Mannheim, Allemagne
Kit de Pierce		thermo Scientific, Rockford, USA
Homogénéisateur		Thomas, Philadelphie, USA
Tampon de migration <ul style="list-style-type: none"> ○ Tris-HCl ○ Glycine ○ SDS 	192mM 0.1%	Acros Organics, USA Biosolve, Pays-Bas Acros Organics, USA
Triton X-100	3%	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Solution formate NaCl : <ul style="list-style-type: none"> ○ Formate ○ NaCl 	0.1M pH 3.7 0.1M	Sigma-Aldrich, Missouri, USA VWR International, Pennsylvanie, USA
Pronase	0.1 mg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Solution formamide	50%	VWR International, Pennsylvanie, USA
Colorant stainsall <ul style="list-style-type: none"> ○ Stainsall stock ○ Formamide 100% ○ H₂O 	6ml 14ml 20ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA VWR International, Pennsylvanie, USA

Tableau 15 : Matériel nécessaire à l'extraction des protéines et la zymographie

Dosage de l'ARN

Le nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Rockford, USA) est calibré en déposant 2µl d'eau RNase free. Un blanc est réalisé avec l'eau RNase free et chaque échantillon est mesuré en déposant 2µl.

9.2. Reverse Transcription [Tableau 18]

Dans un premier temps, les échantillons sont dilués dans l'eau RNase free en fonction des valeurs obtenues lors du dosage au nanodrop ; 1µg d'ARN est dilué dans 11µl d'eau.

En parallèle, deux mix sont préparés. Le premier mix contient 1µl d'oligo dT dilué 10x dans l'eau RNase free et 1µl de dNTP par échantillon. Le deuxième mix contient du tampon 5x, des DDT 0.1M, la superScript II et de l'eau RNase free.

2µl du mix 1 sont ajoutés à chaque échantillon (de 11µl). Les échantillons (contenant un total de 13µl) sont incubés à 65°C pendant 5 minutes dans l'appareil PCR.

7µl du mix 2 sont ensuite ajoutés aux échantillons et les échantillons d'ARN (contenant alors 20µl) sont rétro-transcrit en ADNc par incubation dans l'appareil PCR (50 minutes à 42°C suivi de 15 minutes à 70°C). L'ADNc est conservé à -20°C.

9.3. PCR quantitative [Tableau 19]

Les mix SybrGreen et amorces du gène d'intérêt sont préparés de manière à pouvoir déposer 15µl de mix par puits.

L'ADNc ayant une concentration stock de 50ng/µl, celui-ci doit être dilué 25x dans de l'eau RNase free. Après la dilution, 5µl d'ADNc sont déposés dans chaque puits. La plaque est scellée, centrifugée (1200rpm, 3 minutes) et analysée grâce à l'appareil 7300 real time PCR.

Les amorces [Tableau 20] permettent l'amplification du gène alors que le SybrGreen est un agent intercalant de l'ADN possédant des propriétés fluorescentes. Lorsqu'un gène est amplifié, le SybrGreen s'intercale dans les brins d'ADN qui sont dès lors détectés. Un seuil de fluorescence est déterminé et un nombre de Cq (cycle quantify) y est associé. Le nombre de Cq d'un gène correspond au nombre de cycle PCR qu'il faut pour que la fluorescence émise dépasse le seuil.

Le gène de référence possède également un nombre de Cq et ce nombre est utilisé pour standardiser le nombre de Cq des autres gènes. Le nombre de Cq du gène de référence doit donc être retiré du nombre de Cq du gène, ce qui donne le dCq. Le dCq de la condition contrôle est ensuite soustrait aux autres dCq et ce ddCq pris en valeurs négatives est élevé à la puissance 2 pour obtenir des RQ qui correspondent à l'expression relative de l'ARNm d'un gène (Livak & Schmittgen, 2001).

Composition	Gel de séparation (10%)	Gel de concentration (10%)
Eau	2.8ml	2.9ml
Acrylamide-Bisacrylamide 40%	2.5ml	475µl
Tris/HCl 1.5M/0.5M pH 8.8/6.8	2.5ml	1.25ml
HA crête de coq (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)	1.7ml	/
APS (Persulfate d'Amonium)	500µl	375µl
TEMED (tétraméthyléthylènediamine)	10µl	5µl

Tableau 16 : Composition des gels de séparation et de concentration de la zymographie

Composition	Concentration	Firme
Kit ROCHE extraction d'ARN de kératinocytes murins et provenant des cultures en monocouches		Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne
Kit QIAGEN extraction d'ARN de kératinocytes provenant des épidermes reconstruits		Qiagen GmbH, Marseille, France

Tableau 17 : Matériel nécessaire à l'extraction de l'ARN (qPCR)

Composition	Concentration	Firme
5x First strand buffer ○ Tris-HCl (pH 8.3) ○ KCl ○ MgCl ₂	250mM 375mM 15mM	Invitrogène, Carlsbad, USA
DTT (dithiothréitol)	0.1M	Invitrogène, Carlsbad, USA
dNTP (désoxy-nucléotides tri-phosphate)	10mM	Invitrogène, Carlsbad, USA
SuperScript III RNase H reverse transcriptase	200U/µl	Invitrogène, Carlsbad, USA
Oligo dT	0.5µg/µl	Invitrogène, Carlsbad, USA
Machine RT-PCR		2720 Thermal Cycle, Applied Biosystems, Californie, USA

Tableau 18: Matériel nécessaire à la Reverse Transcription (qPCR)

Composition	Concentration	Firme
Mix qRT-PCR ○ SybrGreen ○ Amorce forward (sens)	10µl/puits 2.5µl/puits	Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne

B. IN VIVO

1. Souris adultes

Les souris utilisées C57BL/6 :

- Wild-type (Hyal1^{+/+}) et (Hyal2^{+/+})
- Knock-out (Hyal1^{-/-}) et (Hyal2^{-/-})

Les souris ont été achetées au MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Center) et les expériences réalisées ont été acceptées par le comité d'éthique animale de l'Université de Namur.

Seules les oreilles des souris adultes sont utilisées. Celles-ci sont obtenues lorsque les souris sont sacrifiées pour une expérimentation.

Chez ces souris adultes, les oreilles sont coupées et utilisées pour des analyses histologiques.

2. Analyses histologiques

Voir point A4, 5 et 6.

3. Mesure du pH cutané et de la résistance électrique trans-épidermique (TEER) [Tableau 21]

Les souriceaux P2-P5 sont euthanasiés à froid c'est-à-dire qu'ils sont déposés dans un berlin rempli de glace à 4°C pendant 5 minutes environ. Les souriceaux de 2 à 5 jours ne possèdent pas encore de poils, rendant l'étude de leur peau plus aisée.

Le pH de leur peau est ensuite mesuré grâce à une sonde spécifique pour mesurer le pH cutané. La simple apposition de la sonde légèrement humidifiée par de l'eau distillée sur la peau permet une mesure de celle-ci. La calibration de cette sonde est réalisée au préalable sur la peau de l'expérimentateur qui attend que les valeurs se stabilisent avant de procéder aux mesures sur souriceaux. Lorsque la sonde est calibrée, celle-ci est mise au contact du dos du souriceau et la mesure du pH est réalisée 3 fois.

La tête, la queue et les pattes sont ensuite coupées avec un scalpel au plus près du corps. Le corps est plongé dans l'isobétadine pour le désinfecter et ensuite dans un bain de solution A pour le rincer. Le corps du souriceau est placé sur le dos et une incision est réalisée sur le ventre d'un bout à l'autre sans couper les viscères. À l'aide de deux pinces plates, la peau est délicatement retirée et posée dans un bain de solution A couche cornée vers le haut.

La peau est ensuite étalée sur un petit anneau en plastique. Un mini-insert est flanqué par-dessus pour tendre la peau. L'ensemble insert-peau est ensuite placé dans un puits. Du PBS-élisa est placé autour de l'insert et dans l'insert, c'est-à-dire au-dessus de la couche cornée.

Le lecteur de TEER est composé de deux sondes qui mesurent une différence de potentiel. Le lecteur est dans un premier temps calibré en plaçant les deux sondes dans une solution de NaOH. Une sonde est ensuite placée dans le milieu situé au-dessus de la couche cornée et la deuxième est placée dans le milieu environnant. La différence de potentiel est mesurée par le lecteur qui affiche le résultat en kOhm.

Les peaux sont ensuite coupées en 4 à 6 plus petits morceaux et disposés couches cornées vers le haut dans des boîtes contenant de la trypsine T25 (pour souriceaux) pendant quelques heures dans l'incubateur maintenant une température de 37°C et une pression partielle en CO₂

○ Amorce reverse (antisens)	2.5µl/puits	Eurogentec, Liège, Belgique
○ ADNc	5µl/puits	
Machine qPCR		Applied Biosystems, Californie, USA

Tableau 19 : Matériel nécessaire à la PCR quantitative

Gènes	Amorces (5'-3')
RPLP0	F: ATCAACGGGTACAAACGAGTC R: CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
hHyal1	F: TCCAGATCTTCTATGACACGACAAA R: TCCTTGATGGCCTGACATGA
hK14	F: CGATGGCAAGGTGGTGTC R: GGGTGAAGCAGGGTCCAG
hK10	F: AATCAGATTCTCAACCTAACAAC R: CTCATCCAGCACCTACG
hIVL	F: TGAAACAGCCAACTCCAC R: TTCCTCTTGCTTTGATGGG
hFLG	F: GGGCACTGAAAGGCAAAAAG R: CACCATAATCATAATCTGCACTACCA
hAlpha 6	F: ATTCTCATGCGAGCCTTCAT R: GGAAACACAGTCACTCGAACC
GAPDH	F: AATGTATCCGTTGTGGATCT R: CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG
mHyal1	F: CAGCATGCTCAGAAAGTTTGG R: TGAGCAAGGTGGGTAAACCAG
mHyal2	F: CGAGGACTCACGGGACTGA R: GGGCACTCTCCCGATGGTAGA
mHyal3	F: CCGGAGCTCTGGGAGATTC R: GCGGCACTCACTCCAATAGTC
mβ-Hex A	F: TTCAAGCAGCTGGAGTCCTTCT R: CCCTTGTCATAATCAGAGACGATGT
mβ-Hex B	F: ACCACTTTTCCTGAGCTAAGCAA R: GGACATCGTTTGGTGTATAGACATG

Tableau 20 : Séquences des amorces sens et anti-sens des primers

Composition	Concentration	Firme
Souriceaux C57BL/6 WT et KO P2 – P5		MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Center)
pH mètre cutané		MDD4, CK electronic, Cologne, Allemagne
Solution A		
Machine résistance électrique		Millicell-ERS, Millipore,

de 5%. Les peaux sont récupérées, transférées dans la solution bloquante et traitées sous hotte à 4°C : séparation du derme et de l'épiderme suivi de la séparation des kératinocytes de l'épiderme en « triturant » et en passant à plusieurs reprises le milieu dans une pipette. La suspension cellulaire est transférée sur un tamis disposé au-dessus d'un tube de 50ml. Les couches cornées se retrouvent dès lors sur le tamis et peuvent être récupérées et transférées dans des tubes à vis de poids connus.

4. Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR

Les cellules éluées dans le falcon sont centrifugées (5 minutes, 1000rpm, 4°C). Le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans 1ml de solution bloquante. La suspension cellulaire peut être transférée dans un eppendorf et stockée à -80°C.

Reverse transcription et PCR quantitative :

Voir points A9.2 et A9.3

5. Dosage HA (ELISA-like). [Tableau 22]

Les couches cornées sont lavées une fois à la solution bloquante et deux fois au PBS-élisa. Les tubes sont ensuite stockés à -20°C.

La technique utilisée pour la détection de l'HA n'est pas un ELISA commun mais un ELISA-like c'est-à-dire que la technique ne se base pas sur la reconnaissance entre un antigène et un anticorps mais sur la reconnaissance d'une protéine avec un sucre. Cependant le principe de base est identique. La plaque 96 puits est recouverte avec de l'aggrecan, protéoglycan du cartilage spécifiquement reconnu par l'acide hyaluronique. Les échantillons de couche cornée étant mis en présence de l'aggrecan dans les puits, la liaison entre l'aggrecan et l'HA est possible. Après plusieurs lavages, une solution de détection contenant de l'aggrecan biotinylé est incubée dans les puits permettant à ce nouvel aggrecan de fixer l'HA lui-même lié dans le fond du puits. Après un certain nombre de lavages, une streptavidine (-peroxydase) est incubée (en présence de son substrat) et permet la révélation colorimétrique de la présence en HA dans les échantillons.

Les couches cornées sont lyophilisées avant d'être resuspendues et mis à ébullition pendant 20minutes dans 300µl de 50mM Tris.HCl pH7.8 (Acros Organics, USA). Les échantillons sont ensuite mis dans la pronase 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) à 40°C. Après une semaine, les échantillons sont à nouveau mis à ébullition pendant 20 minutes afin d'éliminer la pronase et le surnageant est récupéré et stocké à -20°C avant une utilisation ultérieure.

La solution de capture est diluée (5ml de PBS + 20µl d'aggrecan) et incubée dans les puits d'une plaque 96 puits pendant une nuit à température ambiante. Cette manipulation permet de coater les puits avec de l'aggrecan.

Le lendemain, la plaque est lavée trois fois avec la solution de rinçage de manière à éliminer les interférents. La plaque est ensuite incubée avec la solution de blocage pendant 1h. Durant cette heure d'incubation, les échantillons sont dilués (10x ou 50x) et les standards sont dilués de deux en deux pour obtenir une courbe (1800ng/ml, 900ng/ml, 450ng/ml, 225ng/ml, 112.5ng/ml). Une heure plus tard, la plaque est à nouveau lavée avec la solution de rinçage et incubée pour une durée de 2h avec les échantillons et les standards dilués dans le Reagent Diluent (30ml de PBS 1x + 1.5ml de Tween20). Trois lavages à la solution de rinçage sont effectués et la solution de détection (Reagent Diluent + Detection Reagent) est déposée dans

(TEER)		Bruxelles, Belgique
Mini-insert		Scaffdex, Tampere, Finland
PBS-élisa (PBS stérilisé par filtre Têrivex-GP (0.22µm))		Millipore, Bruxelles, Belgique

Tableau 21 : Matériel nécessaire à la mesure du pH cutané et à la mesure de la résistance électrique trans-cutanée

Composition	Concentration	Firme
PBS 1x : <ul style="list-style-type: none"> o KCL o KH₂PO₄ o NaCl o Na₂HPO₄·2H₂O pH 7.2	2.7 mM 15 mM 140 mM 8.1 mM	Merck, Darmstadt, Allemagne Merck, Darmstadt, Allemagne VWR Inter, Pennsylvanie, USA Vel, Texas, USA
Solution de rinçage : <ul style="list-style-type: none"> o PBS 1x o Tween20 	500ml 250µl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Solution de blocage : <ul style="list-style-type: none"> o PBS 1x o Tween20 o NaN₃ 	14.25ml 0.75ml 7.5µl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA Merck, Darmstadt, Allemagne
Kit de détection R&D : <ul style="list-style-type: none"> o AggreCan biotinylé o Substance standard : HA o Substrats A et B (tétraméthylbenzidine) o Solution stop 	1800 ng/ml	R&D Systems, Abington, UK

Tableau 22 : Matériel nécessaire au dosage de l'acide hyaluronique (ELISA-like)

Composition	Concentration	Firme
Embryons C57BL/6 WT et KO E16.5 et E17.5		MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Center)
Méthanol	25%, 50%, 75%, 100%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bleu de Toluidine		Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Tableau 23 : Matériel nécessaire au test de barrière

les puits pour une durée de 2h. Cette solution de détection est une molécule liée à une biotine et qui reconnaît l'acide hyaluronique. Trois rinçages à la solution de rinçage sont réalisés et l'anticorps streptavidine-HRP lié à une peroxydase est incubé pendant 20 minutes. Les 3 derniers lavages ont lieu avant d'incuber 20 minutes avec les solutions substrats A et B en proportion 1 pour 1. Durant les 20 minutes d'incubation, le substrat devient bleu. Sans rincer, la solution bloquante (2N H₂SO₄) est ajoutée au substrat qui vire rapidement à une nuance de jaune.

Le spectrophotomètre (Molecular Device, Berkshire, UK) permet alors une lecture de l'absorbance des différents puits à une longueur d'onde de 450nm et 570nm. La différence des absorbances obtenues à ces deux longueurs d'ondes donnent les valeurs utilisables pour la suite. La courbe d'étalonnage est réalisée à partir des standards et les concentrations en acide hyaluronique des différents échantillons peuvent être établies.

6. Embryons et test de barrière

6.1. Les embryons E16.5 et E17.5

La souris en gestation (au stade E16.5 ou E17.5) est anesthésiée par inhalation d'isoflurane. Lorsque la mère ne respire plus, une césarienne est réalisée et les embryons sont prélevés en gardant leur sac amniotique. Les embryons sont ensuite euthanasiés par hypothermie en les plaçant sur glace.

6.2. Test de barrière [Tableau 23]

Après vérification de l'arrêt de tous mouvements, les embryons sont passés dans des bains successifs de méthanol de plus en plus concentré (25% - 50% - 75% - 100%) à raison de 1 minute/bain, permettant une déshydratation du souriceau. De la même manière, les embryons repassent dans les bains de méthanol en sens inverse (100% - 75% - 50% - 25%) pour les réhydrater. À la fin de ce processus, les embryons sont plongés dans un bain de bleu de toluidine. Dans le cas d'un embryon perméable, le bleu de toluidine va passer au travers des tissus et le rendre tout bleu ; dans le cas d'un embryon imperméable, le bleu de toluidine ne passe pas la barrière cutanée et l'embryon restera de sa couleur initiale. Trente minutes plus tard, les embryons sont sortis du bleu de toluidine et placés sur un fond blanc de manière à faire une photo (Kirschner et al., 2011) (Hardman, Sisi, Banbury, & Byrne, 1998).

RÉSULTATS

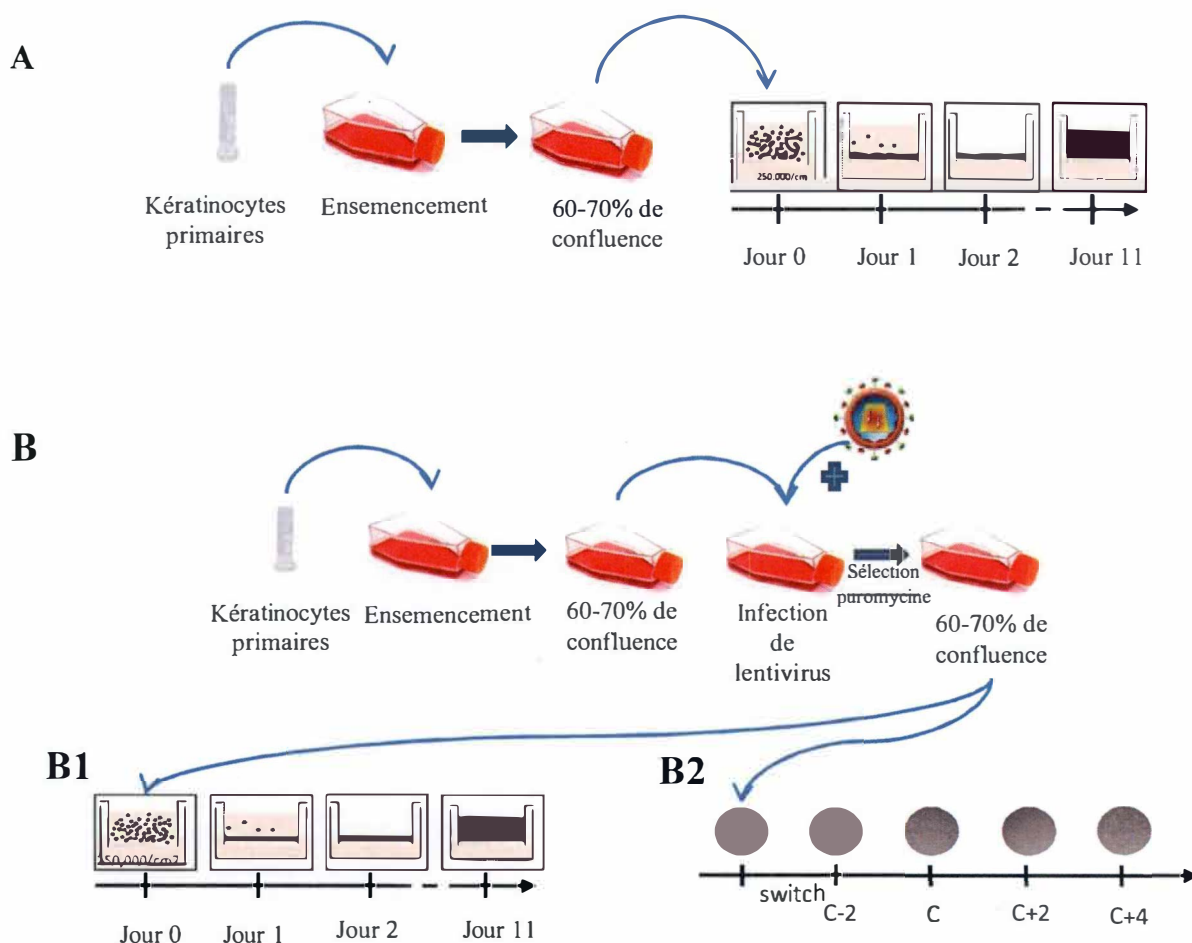


Figure 1 : Développement et infection d'un épiderme reconstruit humain (RHE) et de culture de kératinocytes humains en monocouches.

Une ampoule contenant 1 million de kératinocytes humains est décongelée. Les kératinocytes sont ensemencés avec du milieu permettant leur adhérence et leur prolifération. Le milieu est changé tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 60-70% de confluence, celles-ci sont trypsinisées. **Figure A** : Les cellules sont ensemencées sur un filtre de polycarbonate à 250000 cellules par cm^2 . 24h après l'ensemencement, l'interface à l'air est réalisé et le milieu est changé tous les deux jours. Après 11 jours de reconstruction, un épiderme humain composé des 4 couches caractéristiques est obtenu. **Figure B** : Les cellules sont ensemencées dans un nouvelle boîte et mises en présence de particules virales. Après 24h d'incubation, une sélection est réalisée de manière à ne garder en culture que les cellules ayant été infectées par les particules virales. Le milieu est ensuite changé tous les deux jours. **B1** : Lorsque les cellules atteignent 60-70% de confluence, celles-ci sont trypsinisées et ensemencées sur un filtre de polycarbonate à 250000 cellules par cm^2 . 24h après l'ensemencement, l'interface à l'air est réalisé et le milieu est changé tous les deux jours. Après 11 jours de reconstruction, un épiderme humain composé des 4 couches caractéristiques est obtenu. **B2** : Lorsque les cellules atteignent 60-70% de confluence, celles-ci sont trypsinisées et ensemencées dans des boîtes de culture. Lorsque les cellules atteignent environ 50% de confluence, le milieu présent est remplacé par du milieu ne contenant pas de facteur de croissance. Les cellules sont alors en culture autocrine c'est-à-dire qu'elles produisent leurs propres facteurs de croissance. Les cultures peuvent être vérifiées à différents stades de confluence : 2 jours avant la confluence (C-2), à confluence (C), 2 jours après la confluence (C+2) et 4 jours après la confluence (C+4).

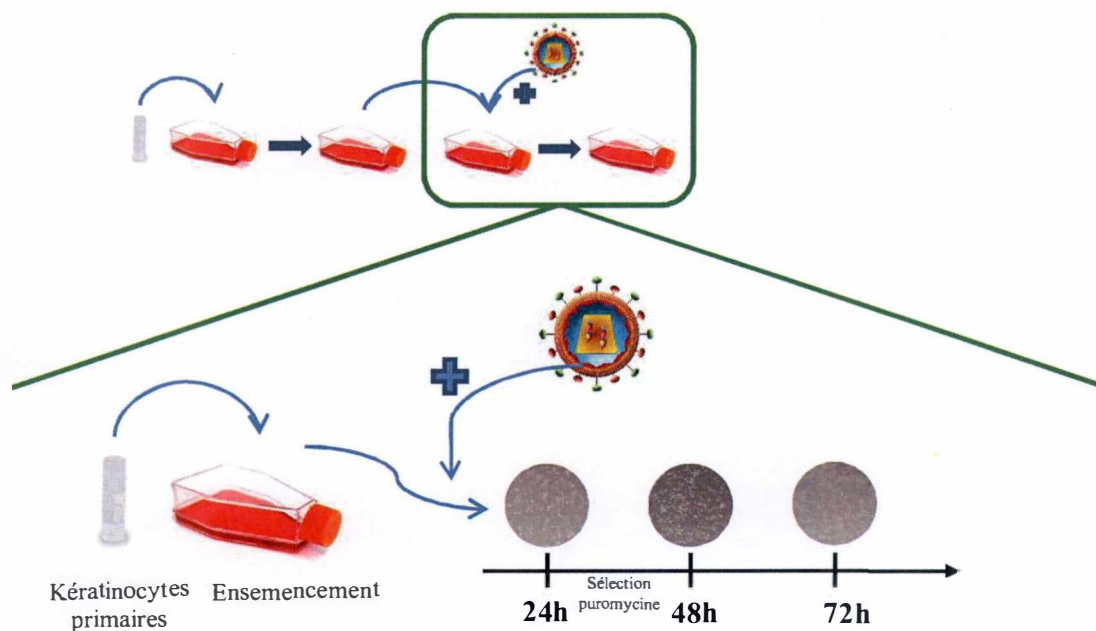


Figure 1C: Suivi de l'infection d'une culture de kératinocytes humains en monocouches.

Une ampoule contenant 1 million de kératinocytes humains est décongelée. Les kératinocytes sont ensemencés avec du milieu permettant leur adhérence et leur prolifération. Le milieu est changé tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 60-70% de confluence, celles-ci sont trypsinisées. Les cellules sont ensemencées dans un nouvelle boîte et mises en présence de particules virales. Après 24h d'incubation, une sélection est réalisée de manière à ne garder en culture que les cellules ayant été infectées par les particules virales. Les cellules sont ensuite étudiées de 24h en 24h.

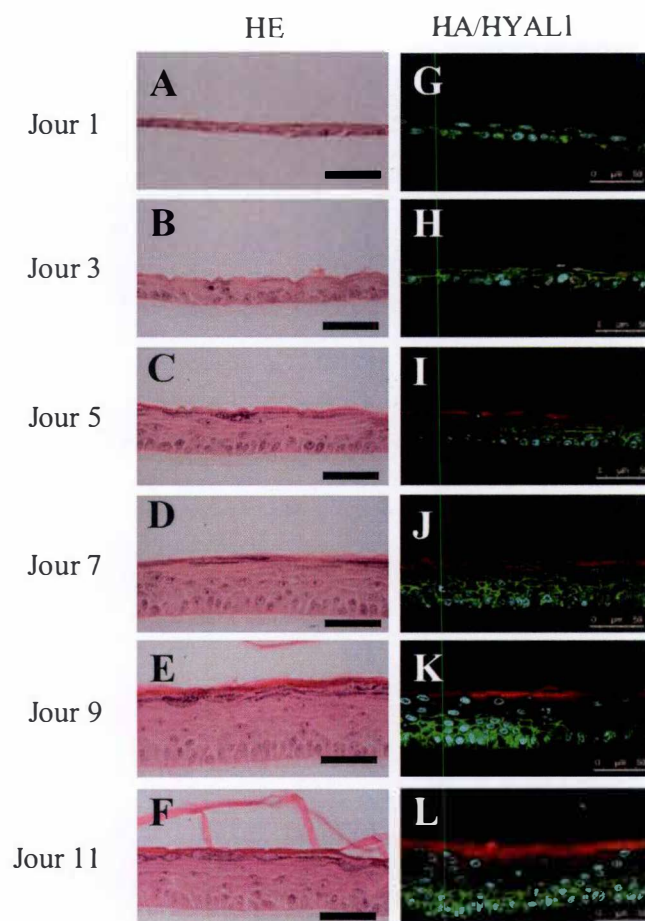


Figure 2 : Morphologie et distribution de l'acide hyaluronique (HA) et de HYAL1 dans un épiderme reconstruit humain.

Les épidermes reconstruits humains sont obtenus après 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours de reconstruction. Les kératinocytes sontensemencés sur un filtre de polycarbonate et l'interface à l'air est réalisé le premier jour de la reconstruction, soit 24h après l'ensemencement. Les épidermes sont ensuite fixés et une étude histologique est réalisée. **Figures A, B, C, D, E et F** : Les épidermes sont colorés de manière à observer leur morphologie: les noyaux sont colorés en bleu par l'hémalum et le cytoplasme en rouge par l'érythrosine. Barre d'échelle = 50µm. **Figures G, H, I, J, K et L** : Une HABP lie spécifiquement l'acide hyaluronique. Cette HABP est une protéine biotinylée qui possède de fortes capacités de liaison avec le hyaluronan. La biotine de l'HABP est reconnue et liée par une streptavidine verte. Un anticorps anti-HYAL1 marque HYAL1 en rouge et les noyaux sont colorés en bleu à l'aide du Hoechst 33258. Barre d'échelle = 50µm.

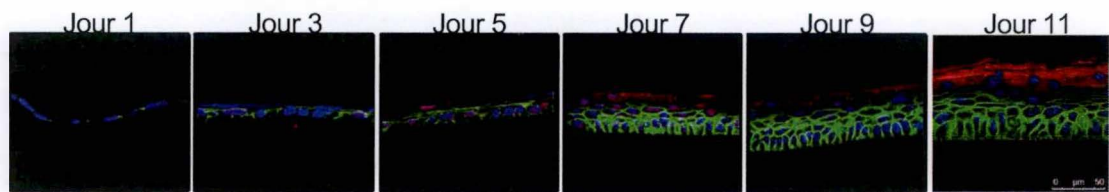


Figure 3A : Marquage et détection de HYAL1 (rouge) et de l'acide hyaluronique (vert) pendant les 11 jours de reconstruction de l'épiderme (Damien Feret, mémoire 2013)

La distribution de l'acide hyaluronique est révélée par l'HABP (Hyaluronic Acid Binding Protein). Cet aggrégane biotinylé lie spécifiquement l'HA. Dans un second temps, une streptavidine couplée à un fluorescent vert se lie spécifiquement à la biotine. HYAL1 est quant à lui marqué au moyen d'un anticorps primaire anti-HYAL1 et d'un anticorps secondaire Alexa 594 qui émet un signal rouge. Les noyaux sont colorés en bleu à l'aide du Hoechst 33258.

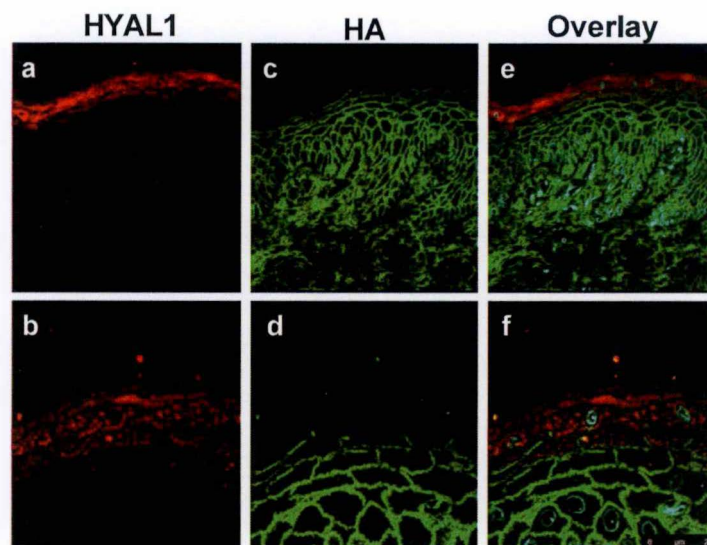


Figure 3B : Marquage et détection de HYAL1 (rouge) et de l'acide hyaluronique (vert) au niveau d'un épiderme d'une peau normale humaine (Jérémy Malaisse, 2013)

La distribution de l'acide hyaluronique est révélée par l'HABP (Hyaluronic Acid Binding Protein). Cet aggrégane biotinylé lie spécifiquement l'HA. Dans un second temps, une streptavidine couplée à un fluorescent vert se lie spécifiquement à la biotine. HYAL1 est quant à lui marqué au moyen d'un anticorps primaire anti-HYAL1 et d'un anticorps secondaire Alexa 594 qui émet un signal rouge.

A. Résultats *IN VITRO*

1. Étude de HYAL1 durant la reconstruction d'un épiderme humain

La reconstruction d'épidermes à partir de kératinocytes humains représente un premier modèle d'étude. Celui-ci permet une reconstruction en 3 dimensions des différentes couches caractéristiques de l'épiderme humain (couche basale, couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée). L'avantage de cette reconstruction 3D est qu'elle fournit un modèle très proche du vivant. En effet, les cellules prolifératives de la couche basale migrent vers les couches supérieures et entament le processus de différenciation jusqu'à former des cornéocytes. Les différents marqueurs de différenciation peuvent dès lors être étudiés.

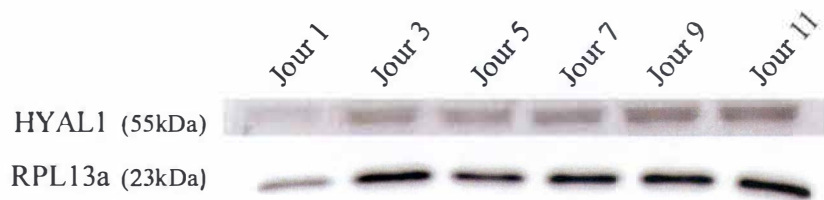
1.1. Morphologie et distribution de l'acide hyaluronique et de HYAL1 lors de la reconstruction d'un épiderme humain

Un million de kératinocytes humains, obtenus à partir de peaux provenant d'abdominoplasties, estensemencé dans une boîte de culture en présence d'un milieu de culture permettant l'adhésion et la prolifération des kératinocytes. Lorsque les cellules atteignent 60 à 70% de confluence, elles sont détachées de la boîte par l'action de la trypsine. Les kératinocytes sont ensuiteensemencés sur un filtre de polycarbonate à raison de 250 000 cellules par cm². Après 24h, l'interface à l'air est réalisée, en d'autres termes, le milieu de culture présent au-dessus des kératinocytes est aspiré pour permettre à l'épiderme de se reconstruire en conditions non immergées. Le milieu sous le filtre de polycarbonate est renouvelé tous les deux jours. Après 11 jours de reconstruction, un épiderme possédant les 4 couches représentatives d'un épiderme normal humain est obtenu [figure 1A]. Afin d'étudier la morphologie de l'épiderme et surtout la localisation de l'acide hyaluronique et de HYAL1 durant ce processus de reconstruction, les épidermes reconstruits humains, obtenus après 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours de reconstruction sont fixés et analysés par les techniques histologiques.

Une coloration hémalum – érythrosine (HE) permet de mettre en évidence la morphologie des épidermes reconstruits. L'hémalum colore en bleu les noyaux et l'érythrosine colore en rose-rouge le cytoplasme des cellules. Lors du 1^{er} jour de reconstruction, une couche basale composée d'une seule assise cellulaire est observée. Au 3^{ème} jour de reconstruction, une couche épineuse apparaît au-dessus de la couche basale. À partir du 5^{ème} jour, une couche granuleuse devient visible et les diverses couches de l'épiderme commencent à s'épaissir. La couche cornée, quant à elle, apparaît au 9^{ème} jour de reconstruction. Après 11 jours de reconstruction, un épiderme possédant les 4 couches caractéristiques est obtenu et montre une morphologie identique à celle d'un épiderme normal humain [figure 2A, B, C, D, E et F]. La morphologie observée est similaire à celle obtenue habituellement dans notre laboratoire (Frankart et al., 2012). Cet épiderme, similaire à un épiderme *in vivo*, constitue donc un bon modèle pour l'étude de ce tissu cutané.

Le but de ce projet étant l'étude de HYAL1 dans l'épiderme, la localisation de cette enzyme au sein d'un épiderme reconstruit a été étudiée. De plus, HYAL1 jouant un rôle dans la dégradation de l'acide hyaluronique, la distribution de ce dernier a retenu également notre attention. Dès lors, l'acide hyaluronique ainsi que HYAL1 ont été marqués sur des coupes d'épidermes à 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours de reconstruction [figure 2G, H, I, J, K et L]. La distribution de l'acide hyaluronique est révélée par l'HABP (Hyaluronic Acid Binding Protein). Cet aggrégane biotinylé lie spécifiquement l'HA. Dans un second temps, une streptavidine couplée à un fluorescent vert se lie spécifiquement à la biotine. HYAL1 est quant à lui marqué au moyen d'un anticorps primaire anti-HYAL1 et d'un anticorps secondaire Alexa 594 qui émet un signal rouge. Les noyaux sont colorés en bleu à l'aide du

A



B

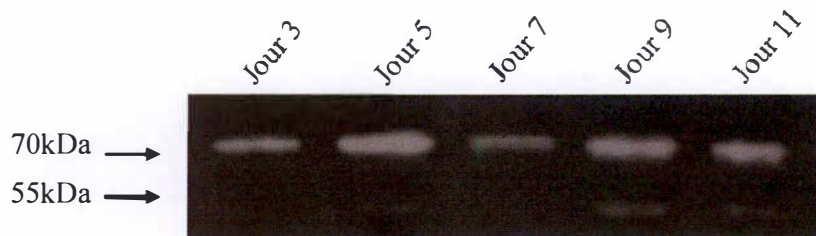


Figure 4 : Abondance protéique et activité enzymatique de HYAL1 dans un épiderme reconstruit humain.

Les épidermes reconstruits humains sont obtenus après 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours de reconstruction. Les kératinocytes sontensemencés sur un filtre de polycarbonate et l'interface à l'air est réalisé le premier jour de la reconstruction, soit 24h après l'ensemencement. **Figure A** : Les protéines de chaque épiderme reconstruit sont extraites. Les protéines migrent sur gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire, sont transférées sur une membrane de polyvinyle et sont enfin marquées au moyen d'anticorps spécifiques (HYAL1 et RPL13a). RPL13a est utilisé comme contrôle de charge. **Figure B** : Les protéines des épidermes reconstruits sont extraites. Les protéines migrent sur gel d'électrophorèse contenant de l'acide hyaluronique. Après incubation du gel au pH optimum de HYAL1, celui-ci est coloré avec du Stainsall 0,01%. Les bandes blanches qui apparaissent correspondent aux zones où l'acide hyaluronique présent dans le gel a été dégradé.

Hoechst 33258. L'acide hyaluronique apparaît dès le premier jour de reconstruction au niveau des espaces extracellulaires. Tout au long de la reconstruction de l'épiderme, l'acide hyaluronique est présent dans les couches basales et épineuses. En revanche, HYAL1 apparaît seulement au cinquième jour de la reconstruction et semble être spécifiquement localisé au niveau de la couche granuleuse. D'autre part, aucune co-localisation n'est observée entre l'acide hyaluronique et HYAL1, ce qui suggère une disparition de l'acide hyaluronique simultanée à l'apparition de HYAL1. Ces résultats sont cohérents et confirment les résultats obtenus précédemment par Damien Feret lors de son mémoire et mettant en évidence la présence de HYAL1 dans la couche granuleuse de la peau normale humaine [figure 3A et B].

1.2. Abondance protéique et activité enzymatique de HYAL1 lors de la reconstruction d'un épiderme humain

HYAL1 apparaît au niveau de la couche granuleuse dès le cinquième jour de reconstruction de l'épiderme. Pour déterminer dans quelle mesure cette enzyme est en effet présente et active, des études de l'abondance protéique (Western Blot) et de l'activité enzymatique (zymographie) ont été réalisées.

Les protéines des épidermes humains reconstruits obtenus à 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours sont ensuite extraites. Les protéines, soumises à un courant électrique, migrent sur un gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire. Celles-ci sont ensuite transférées sur une membrane, laquelle est utilisée pour l'immuno-détection. Un anticorps primaire anti-HYAL1 cible HYAL1 et un anticorps secondaire couplé à une peroxydase-HRP permet de mettre en évidence la présence de la protéine. De même, le marquage de RPL13a est utilisé comme contrôle de charge [figure 4A]. HYAL1 est détecté à 55kDa, qui représente son poids moléculaire spécifique. La quantité de protéines HYAL1 apparaît plus ou moins stable durant la reconstruction de l'épiderme. Ceci suggère que les protéines HYAL1 seraient présentes dès le premier jour de la reconstruction.

Bien que la détection de la protéine soit positive, cela ne signifie en aucun cas que HYAL1 se trouve actif au premier jour, ni durant tout le processus de reconstruction de l'épiderme. Dès lors, une zymographie permettant de détecter l'activité enzymatique de HYAL1 a été réalisée.

Les protéines des épidermes humains reconstruits sont extraites en conditions non-dénaturantes de manière à conserver leur structure tridimensionnelle. Les protéines, soumises à un courant électrique, migrent sur un gel de polyacrylamide contenant de l'acide hyaluronique. Le gel est ensuite incubé à 37°C et au pH optimum de HYAL1, soit à pH 3.7. Après deux jours, l'acide hyaluronique contenu dans le gel est coloré à l'aide du Stainsall. Les zones blanches correspondent aux zones où l'HA présent dans le gel a été dégradé et donc mettent en évidence l'activité enzymatique de HYAL1 à un poids moléculaire donné [figure 4B]. L'enzyme apparaît active au niveau de deux poids moléculaires : 55 et 70kDa qui correspondent tous deux à HYAL1. L'activité enzymatique de HYAL1 est présente à partir du troisième jour et apparaît relativement stable pendant toute la durée de la reconstruction, c'est-à-dire jusqu'au onzième jour. Ces résultats sont donc cohérents avec ce qui a été observé pour l'abondance protéique de HYAL1 lors de la reconstruction de l'épiderme [figure 4A]. Cependant, aucune mesure de l'activité de HYAL1 au jour 1 n'a pu être réalisée en raison de la trop faible quantité de protéines.

Ces deux études (abondance protéique et activité enzymatique) ont été répétées sur des épidermes humains reconstruits sur base de kératinocytes provenant de donneurs différents. Les résultats obtenus sont similaires.

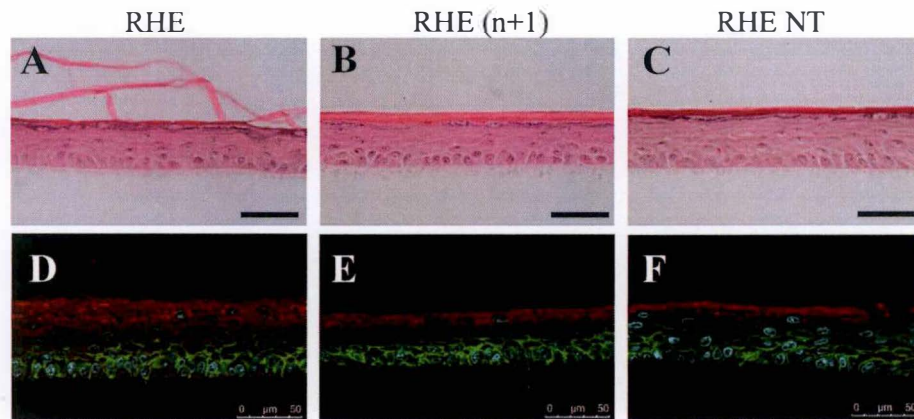


Figure 5 : Morphologie et distribution de l'acide hyaluronique et de HYAL1 au 11^{ème} jour de reconstruction d'un épiderme humain.

L'infection des kératinocytes par des particules virales nécessite un passage supplémentaire (n+1). Durant ce passage supplémentaire, les kératinocytes sont infectés ou non avec des particules virales non-target (NT). Ces particules virales non-target ne possèdent aucun cible connue dans le génome humain et sont donc utilisées comme contrôle. Les kératinocytes sont ensuite ensemencés sur un filtre de polycarbonate et les épidermes sont obtenus après 11 jours de reconstruction. Ceux-ci ont été fixés et une étude histologique a été réalisée. **Figures A, B et C** : Les noyaux des épidermes sont colorés en bleu par l'hémalum et le cytoplasme en rouge par l'érythrosine. **Figure D, E et F** : Une HABP lie spécifiquement l'acide hyaluronique. Cette HABP est une protéine biotinylée qui possède de fortes capacités de liaison avec le hyaluronan. La biotine de l'HABP est reconnue et liée par une streptavidine verte. Un anticorps anti-HYAL1 marque HYAL1 en rouge et les noyaux sont colorés en bleu à l'aide du Hoechst 33258. Barre d'échelle = 50µm.

L'immunoréactivité de HYAL1 montre que celui-ci apparaît à partir du cinquième jour de reconstruction alors que l'abondance protéique et l'activité enzymatique sont présentes dès le premier jour de la reconstruction. Cela suggère que HYAL1 serait présent et actif avant la formation de la couche granuleuse.

Le modèle de reconstruction d'épidermes étant complètement caractérisé et la localisation ainsi que l'abondance et l'activité de HYAL1 ayant été déterminées, une étude plus spécifique du rôle de HYAL1 dans l'épiderme peut être mise en œuvre.

1.3. Mises au point de la technique 'lentivirus' sur épidermes reconstruits

Afin d'étudier les effets de l'activité d'une enzyme telle que HYAL1, deux techniques sont envisageables : l'enzyme peut être surexprimée ou inhibée. L'inhibition de HYAL1 de façon stable dans les épidermes est le modèle choisi. Dès lors, des particules virales exprimant un shRNA peuvent être utilisées pour inactiver HYAL1 dans les kératinocytes. Ces lentivirus sont des vecteurs capables de s'insérer dans le génome des cellules et de leur faire exprimer des shRNA capables de cibler l'ARNm d'un gène particulier, tel que HYAL1.

Tout d'abord, la reconstruction d'un épiderme humain a été évaluée après un passage supplémentaire des kératinocytes primaires (n+1) mais sans infection par les lentivirus. Ce passage supplémentaire est nécessaire pour permettre la sélection des cellules ayant été infectées par les lentivirus et d'éliminer les autres kératinocytes. Dans un second temps, la même expérience a été réalisée en présence de lentivirus exprimant des shRNA *non-target*, c'est-à-dire ne possédant aucune cible (séquence complémentaire) connue dans le génome humain. Le but de ces deux expérimentations était de détecter des conséquences éventuelles sur la morphologie ou la distribution de l'acide hyaluronique ainsi que d'HYAL1 dans un épiderme reconstruit, en conséquence d'un passage supplémentaire ou de l'incorporation des lentivirus par les kératinocytes.

À nouveau, des kératinocytes sontensemencés dans un milieu de culture. Lorsque les cellules atteignent 60 à 70% de confluence, celles-ci sont trypsinisées et ensemencées dans une nouvelle boîte de culture en présence de particules virales. C'est ce deuxième ensemencement qui est nommé 'passage supplémentaire' (n+1). Après 24h d'incubation, la sélection en présence de puromycine est réalisée de manière à ne garder que les kératinocytes ayant incorporé des particules virales. Lorsque les cellules atteignent 60 à 70% de confluence, celles-ci sont à nouveau trypsinisées pour être ensemencées sur filtres de polycarbonate à raison de 250 000 cellules par cm². Après 24h, l'interface à l'air est réalisée et le milieu environnant est renouvelé tous les deux jours. Après 11 jours de reconstruction, un épiderme possédant les 4 couches représentatives d'un épiderme normal humain est obtenu [figure 1B1]. Les épidermes reconstruits de base peuvent être comparés aux épidermes reconstruits avec un passage supplémentaire ou aux épidermes infectés par des lentivirus *non-target* (NT). Les trois types d'épidermes reconstruits humains sont fixés après 11 jours de reconstruction et analysés par une approche morphologique.

Une coloration hémalum – érythrosine (HE) permet de mettre en évidence la morphologie des épidermes reconstruits, qui apparaît identique dans les trois conditions [figure 5A, B et C]. L'épaisseur globale des épidermes est similaire et une stratification normale est visible (couche basale, couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée).

L'acide hyaluronique ainsi que HYAL1 sont détectés sur des coupes d'épidermes au 11^{ème} jour de reconstruction, de manière à observer leur localisation et leur distribution pour les trois conditions [figure 5D, E et F]. Dans les trois conditions, l'acide hyaluronique apparaît

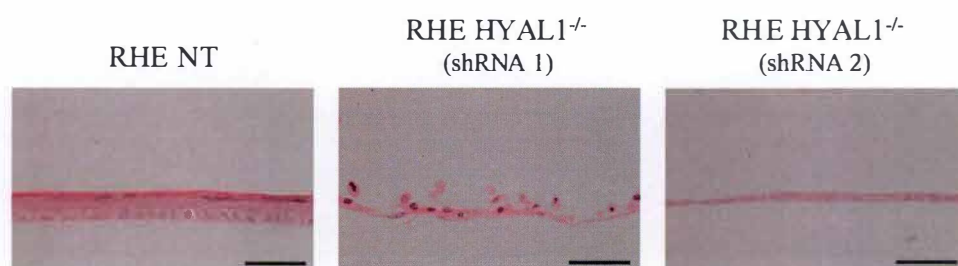


Figure 6 : Morphologie au 11^{ème} jour de reconstruction d'un épiderme humain infecté par des particules virales.

Afin d'inactiver HYAL1 dans un épiderme reconstruit humain (RHE), des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sontensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome humain sont utilisées comme contrôle. L'infection des kératinocytes par des particules virales nécessite un passage supplémentaire durant lequel les kératinocytes sont infectés avec des particules virales. Les kératinocytes sont ensuiteensemencés sur un filtre de polycarbonate et les épidermes sont obtenus après 11 jours de reconstruction. Ceux-ci ont été fixés et une étude histologique a été réalisée. Les noyaux des épidermes sont colorés en bleu par l'hémalun et le cytoplasme en rouge par l'érythrosine. Barre d'échelle = 50µm.

dans les couches basales et épineuses, alors qu'HYAL1 montre une localisation identique et spécifique de la couche granuleuse. À nouveau, aucune co-localisation n'est observée entre l'acide hyaluronique et HYAL1.

En conclusion, le passage supplémentaire et l'infection par les particules virales *non-target* n'induisent pas de modification de la morphologie et de la distribution de l'acide hyaluronique et de HYAL1 dans les épidermes reconstruits humains.

1.4. Infection par lentivirus des épidermes humains reconstruits

Les mises au point réalisées au point 1.3 ne provoquant pas d'altération de la reconstruction des épidermes et de la localisation de l'HA et de HYAL1, les lentivirus exprimant un shRNA peuvent être utilisés pour étudier le rôle de HYAL1 dans les épidermes. Les épidermes humains sont reconstruits comme décrit sur la figure 1B1, avec infection par des particules virales exprimant des shRNA (de types 1 ou 2) qui ciblent le transcrite de HYAL1. Un troisième et quatrième shRNA qui ciblent le transcrite de HYAL1 ont également été testés. Cependant, lors de la sélection via la puromycine, tous les kératinocytes étaient incapables de résister à la sélection [résultat non présenté].

La comparaison de la morphologie des épidermes reconstruits infectés par des lentivirus qui ciblent l'ARNm de HYAL1 (shRNA1 et 2) par rapport aux épidermes infectés par des lentivirus *non-target* (NT) permet de mettre en évidence les conséquences phénotypiques d'une inhibition de HYAL1. Les épidermes reconstruits humains de ces trois conditions, obtenus après 11 jours de reconstruction, sont fixés et une étude histologique est réalisée.

À nouveau, une coloration hémalum – érythrosine (HE) est réalisée [figure 6]. L'épiderme reconstruit à partir de kératinocytes infectés par des lentivirus exprimant des shRNA NT montre une stratification normale comprenant les quatre couches représentatives d'un épiderme, comme observé précédemment (figure 5). Par contre, les épidermes reconstruits à partir des kératinocytes infectés par des lentivirus exprimant les shRNA 1 ou 2 apparaissent très minces. Avec à peine une assise cellulaire, ces épidermes sont aussi fins que les épidermes analysés après 1 jour de reconstruction.

Au vu de la minceur des épidermes reconstruits, le matériel présent (ARN, protéine) est insuffisant pour permettre une étude de l'expression des ARNm, une analyse de l'abondance protéique ou de l'activité enzymatique. Dès lors, la comparaison de l'abondance protéique et de l'activité enzymatique de HYAL1 entre les épidermes reconstruits de base et les épidermes reconstruits infectés par des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrite de HYAL1 n'a pu être réalisée. La mise en évidence d'une inhibition de HYAL1 est donc impossible. C'est pourquoi un modèle plus simple que les épidermes reconstruits a été utilisé : les cultures autocrines en monocouche.

2. Étude d'une déficience en HYAL1 dans les kératinocytes humains en monocouche

Au vu des problèmes rencontrés lors de la tentative de reconstruction d'un épiderme humain déficient en HYAL1, un deuxième modèle d'étude a été utilisé. Les kératinocytes humains sont cultivés en monocouche. Ce modèle, moins proche d'un épiderme normal, ne permet pas la reconstruction en trois dimensions. La culture en monocouche permet néanmoins une forte prolifération des kératinocytes suivie d'un processus de différenciation lorsque les cultures des cellules atteignent la confluence.

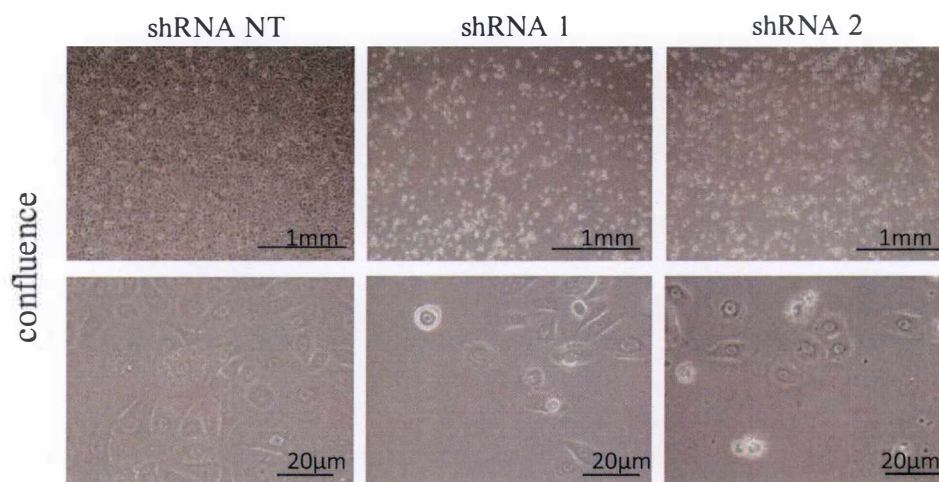


Figure 7 : Morphologie des kératinocytes infectés par des particules

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sont ensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome des kératinocytes sont utilisées comme contrôle. La morphologie des 3 conditions est observée. Les cultures de kératinocytes infectés par des particules virales non-target sont utilisés comme référence du stade de confluence. Barre d'échelle = 1mm et 20µm.

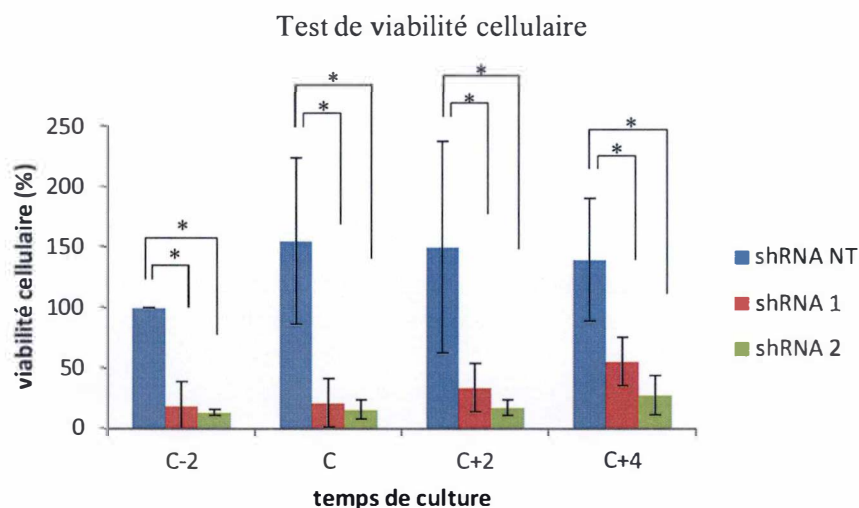


Figure 8 : Viabilité des kératinocytes infectés par des particules virales à différents stades de confluence.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sont ensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome des kératinocytes sont utilisées comme contrôle. La viabilité cellulaire de ces 3 conditions est étudiée à partir de 2 jours avant la confluence (C-2) jusqu'à 4 jours après la confluence (C+4). Cette viabilité est exprimée en pourcent et les kératinocytes infectés par des particules virales non-target (NT) deux jours avant la confluence (C-2) représentent le pourcentage de viabilité de référence (100%). Cette expérience a été réalisée en triplicat. Une ANOVA 2 est utilisée avec un intervalle de confiance de 95% (* = $p < 0,05$)

2.1. Morphologie et viabilité des kératinocytes infectés par des particules virales

La méthode d'infection des kératinocytes est similaire à ce qui a été réalisé précédemment lors de la reconstruction d'épidermes. Des kératinocytes sontensemencés dans une boîte de culture en présence d'un milieu favorisant l'adhésion et la prolifération cellulaire. Lorsque les cellules atteignent 60 à 70% de confluence, celles-ci sont trypsinisées etensemencées dans une nouvelle boîte de culture en présence de particules virales. Après 24h d'incubation, la sélection en présence de puromycine est réalisée de manière à ne garder que les kératinocytes ayant incorporé des particules virales. Lorsque les cellules atteignent 60 à 70% de confluence, celles-ci sont à nouveau trypsinisées etensemencées dans des boîtes de culture. Le milieu est changé tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 50% de confluence, le milieu présent est remplacé par du milieu ne contenant aucun facteur de croissance. Les cellules sont alors en culture autocrine, c'est-à-dire qu'elles produisent leurs propres facteurs de croissance. Différents stades peuvent alors être étudiés. Deux jours avant la confluence (C-2) correspond à un stade auquel les kératinocytes sont en prolifération, la confluence (C) correspond au stade où les cellules perdent leur pouvoir prolifératif pour entrer dans le processus de différenciation, deux jours (C+2) et quatre jours après la confluence (C+4) représentent des stades auxquels les kératinocytes sont en différenciation [figure 1B2]. Les cultures de cellules infectées avec des lentivirus exprimant des shRNA NT peuvent être comparées aux cultures cellulaires infectées par des lentivirus exprimant les shRNA 1 ou 2.

Les cellules infectées par un shRNA NT représentent la culture contrôle. En effet, seules ces cellules atteignent la confluence. En revanche, les cellules infectées par les shRNA 1 et 2 apparaissent beaucoup moins nombreuses, moins adhérentes à la boîte et présentent une morphologie particulière [figure 7].

Au vu de la morphologie de ces cellules et de leur nombre réduit, une possible cytotoxicité des particules virales a été supposée. Pour répondre à cette hypothèse, un test de viabilité cellulaire a été réalisé. Dans ce test, les cultures de cellules infectées par les 3 types de shRNA (NT, 1 et 2) sont analysées à différents stades de confluence déterminés par la culture contrôle (cellules infectées par les shRNA NT) : 2 jours avant la confluence, à confluence, 2 et 4 jours après la confluence. Ces cultures sont incubées pendant 1h avec le sel de tétrazolium MTT. Lorsque les cellules sont vivantes, ce réactif est réduit en formazan qui forme un précipité violet. La viabilité cellulaire (fonction de la quantité de précipité mesurée) est exprimée en pourcentage de cellules vivantes par rapport à la population totale de cellules en culture.

Le pourcentage de cellules vivantes est significativement moins important dans les cultures infectées par des shRNA 1 ou 2 que dans les cultures infectées par des shRNA NT pour les 4 stades de confluence. Cependant, une tendance à l'augmentation du pourcentage de cellules vivantes est observée entre C-2 et C+4 pour les cultures infectées par des shRNA 1 et 2 [figure 8]. Cela suggère un accroissement de la population cellulaire avec le temps. Une hypothèse serait que les cellules transduites par un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 proliféreraient plus lentement que les cellules infectées par des shRNA NT. Dès lors, ce phénotype particulier pourrait être directement lié à l'inhibition de HYAL1 dans les kératinocytes en culture.

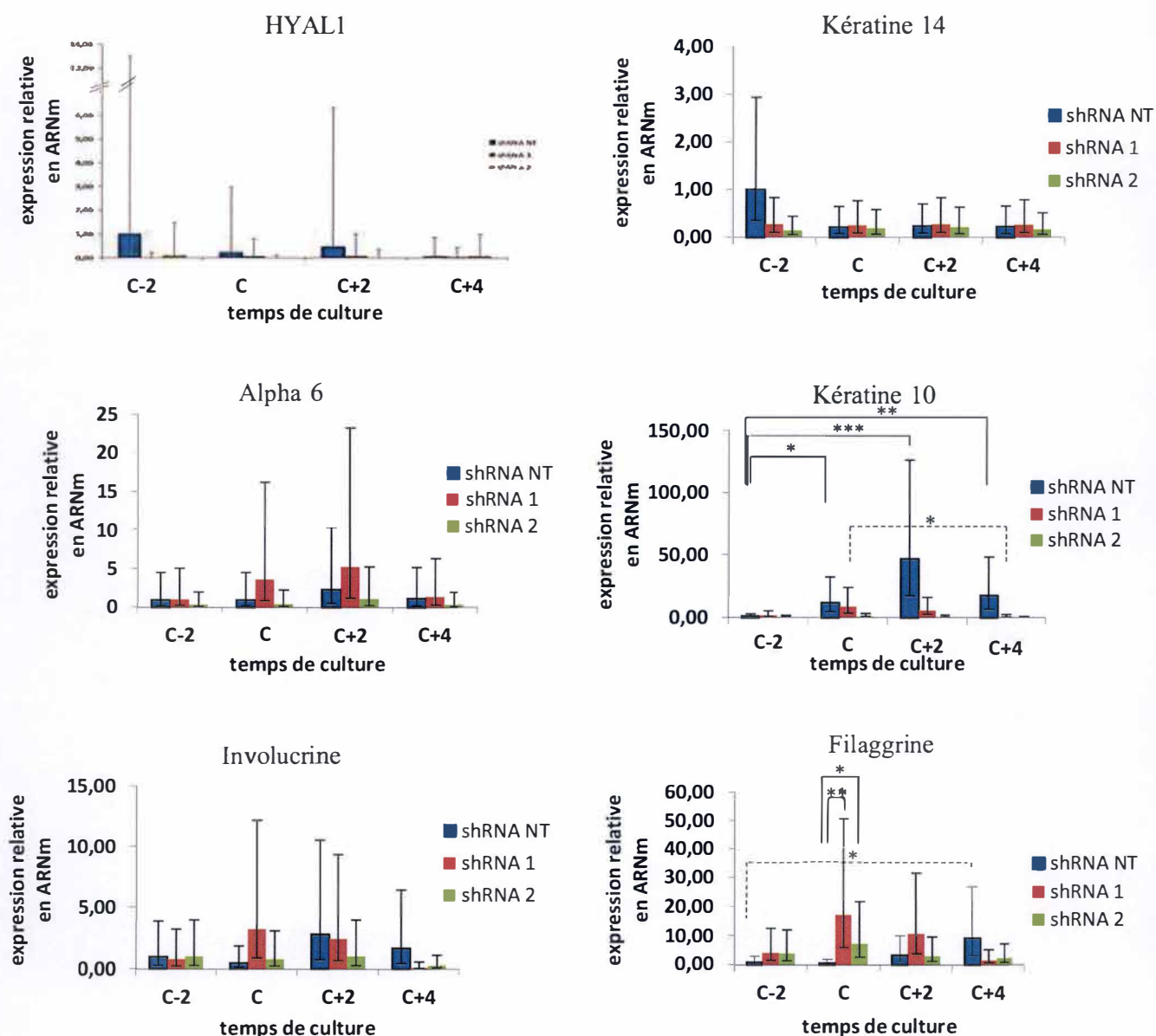


Figure 9 : Expression relative en ARNm de HYAL1 et de marqueurs de différenciation dans des kératinocytes infectés par des particules virales à différents stades de confluence.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sont ensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome des kératinocytes sont utilisées comme contrôle. Les ARN des kératinocytes des 3 conditions sont extraits à différents stades de confluence : 2 jours avant la confluence (C-2), à confluence (C), 2 jours après la confluence (C+2) et 4 jours après la confluence (C+4). Les ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire avant d'être analysés par qPCR. Les niveaux d'expression des gènes HYAL1, kératine 10, kératine 14, involucrine, filaggrine et alpha 6 ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène de référence (RPLP0). L'expression en ARNm de la condition non-target (shRNA NT) au stade C-2 a été défini comme valeur égale à 1. L'expérience a été réalisée en triplicat. Une *ANOVA 2 Repeated Measures* a été réalisée sur l'ensemble des ΔCq avec un intervalle de confiance de 95% (* = $p < 0,05$ / ** = $p < 0,01$ / *** = $p < 0,001$).

2.2. Expression relative de HYAL1 et de marqueurs de différenciation à différents stades de confluence

Le but de l'infection des kératinocytes par des particules exprimant des shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1 étant d'inactiver HYAL1 dans les cellules, l'évolution du niveau d'expression de HYAL1 au cours du temps est mesurée.

Les cellules sont cultivées en monocouche autocrine comme expliqué à la figure 1B2. Les cultures de cellules infectées par les trois types de shRNA (NT, 1 et 2) sont arrêtées à différents stades de confluence. Les ARN totaux de chaque condition sont extraits et rétro-transcrits en ADN complémentaire. Cet ADN complémentaire est analysé par PCR en temps réel. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène de référence RPLP0 [figure 9].

Les cultures infectées par des shRNA NT représentent les conditions contrôles et donc les cultures de référence. L'expression relative des ARNm de HYAL1 dans les kératinocytes infectés par des shRNA NT varie entre les différents stades de confluence. Néanmoins, l'expression relative de HYAL1 apparaît plus importante deux jours avant la confluence (stade prolifératif) que quatre jours après la confluence (stade de différenciation), comme cela avait été observé par Damien Feret lors de son mémoire. Mais cela est non significatif au vu de la grande variabilité observée entre les triplicats.

L'expression relative de HYAL1 dans les cultures infectées par des shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1 (shRNA1 et 2) a également été mesurée en comparaison aux cultures de référence. HYAL1 apparaît moins exprimé aux quatre stades de confluence (C-2, C, C+2 et C+4) par rapport à la condition NT, mais ce gène n'est cependant pas inhibé. De plus, au vu de la forte variabilité des réplicats, aucune diminution statistiquement significative n'est observée.

L'expression de HYAL1 dans les kératinocytes en culture n'étant pas inhibée, la morphologie anormale des cellules observée à la figure 7 ne peut être due à l'absence de HYAL1. Une nouvelle hypothèse apparaît : le phénotype particulier des kératinocytes pourrait être dû à une modification de la différenciation avec, par exemple, une différenciation précoce. Dès lors, l'expression des ARNm de divers marqueurs de différenciation basaux, précoces et tardifs a été mesurée aux différents stades de confluence (C-2, C, C+2, C+4).

La kératine 14 est un marqueur basal de la différenciation c'est-à-dire qu'il est exprimé lors de la phase proliférative (C-2) et est ensuite réprimé (Minner et al., 2010). L'expression relative de la kératine 14 dans les cultures infectées par des shRNA NT (condition de référence) apparaît élevée deux jours avant la confluence, c'est-à-dire en stade de prolifération active. Par contre, l'expression de ce marqueur basal est beaucoup plus faible aux trois autres stades de confluence (C, C+2, C+4). Au vu de la forte variabilité entre les réplicats, aucune variation statistique ne peut être mise en évidence entre l'expression de la kératine 14 à C-2 et aux autres stades de confluence.

En ce qui concerne les cultures cellulaires infectées par des particules virales exprimant des shRNA qui ciblent HYAL1 (shRNA 1 et 2), les niveaux d'expression de la kératine 14 apparaissent relativement stables entre les différents stades de confluence. À nouveau, les variations d'expression entre les réplicats ne permettent pas d'obtenir des différences statistiques entre les stades de confluence et entre les conditions d'infection (infection de type shRNA NT, shRNA 1 et shRNA 2).

La sous-unité d'intégrine alpha 6 est également un marqueur basal. L'expression d'alpha 6 est plus ou moins stable au travers des différents stades de confluence pour les cultures infectées par des shRNA NT et des shRNA 2. En ce qui concerne les cultures infectées par des shRNA de type 1, une tendance à l'augmentation de l'expression d'alpha 6 est observée deux jours après la confluence (C+2). Cette augmentation n'est pas significative.

La kératine 10 est un marqueur précoce de différenciation. Dans un épiderme en trois dimensions, ce type de marqueur est exprimé au niveau des couches supra-basales, au début du processus de différenciation (Minner et al., 2010). L'expression relative de la kératine 10 dans les cultures infectées par des shRNA NT augmente de manière significative en fonction du degré de confluence. L'expression de ce gène est augmentée de façon significative entre C-2 et C, de façon très hautement significative entre C-2 et C+2 et de façon hautement significative entre C-2 et C+4. Ce résultat est cohérent avec ce qui est observé dans la littérature. En effet, une forte augmentation de la kératine 10 est observée deux jours après la confluence, soit au début de la différenciation des kératinocytes (Minner et al., 2010).

L'expression de la kératine 10 dans les cultures infectées par des shRNA qui cible le transcrite de HYAL1 (shRNA 1 et 2) ne suit pas le profil observé dans les cultures contrôles (shRNA NT) et reste relativement basse. Une diminution statistiquement significative de l'expression de la kératine 10 est observée entre le stade de confluence et quatre jours après la confluence dans les cultures cellulaires infectées par des shRNA qui ciblent le transcrite de HYAL1 (type 1).

L'involucrine est un marqueur tardif de différenciation caractérisé par un niveau d'expression plus élevé quatre jours après la confluence (Minner et al., 2010). L'expression relative de l'involucrine dans les cultures infectées par des shRNA NT est relativement variable avec une tendance à l'augmentation à deux jours et quatre jours après la confluence.

L'expression relative de l'ARNm de l'involucrine dans les cultures cellulaires infectées par des shRNA de type 1 et 2 ne subit pas de variations significatives.

Enfin, la filaggrine est également un marqueur tardif de différenciation. L'expression de la filaggrine dans les cultures infectées par des shRNA NT augmente de manière progressive de deux jours avant la confluence à quatre jours après la confluence. Cette augmentation de l'expression de la filaggrine de C-2 à C+4 est statistiquement significative et conforme aux résultats attendus.

En ce qui concerne l'expression de la filaggrine dans les cultures infectées par des shRNA qui ciblent l'ARNm de HYAL1 (shRNA 1 et 2), le profil est différent de ce qui est observé dans les cultures infectées par les shRNA NT. L'expression de filaggrine est augmentée au stade de confluence. Cette augmentation est hautement significative dans les cultures infectées par les shRNA de type 1 et simplement significative dans les cultures infectées par des shRNA de type 2.

Contrairement à ce qui était attendu, HYAL1 est apparemment exprimé dans les cellules malgré l'infection pour produire des shRNA qui ciblent le transcrite de HYAL1. Le phénotype particulier des kératinocytes ne peut dès lors pas être attribué à l'absence de HYAL1. Cependant, une modification du profil d'expression de plusieurs marqueurs de différenciation est observée dans les cultures infectées par ces mêmes shRNA. Notamment, une modification importante dans le profil d'expression de la kératine 10 est constatée. Également, une augmentation de l'expression de l'involucrine et de la filaggrine à confluence est mise en évidence et ce, de façon significative pour la filaggrine, alors qu'il s'agit de marqueurs

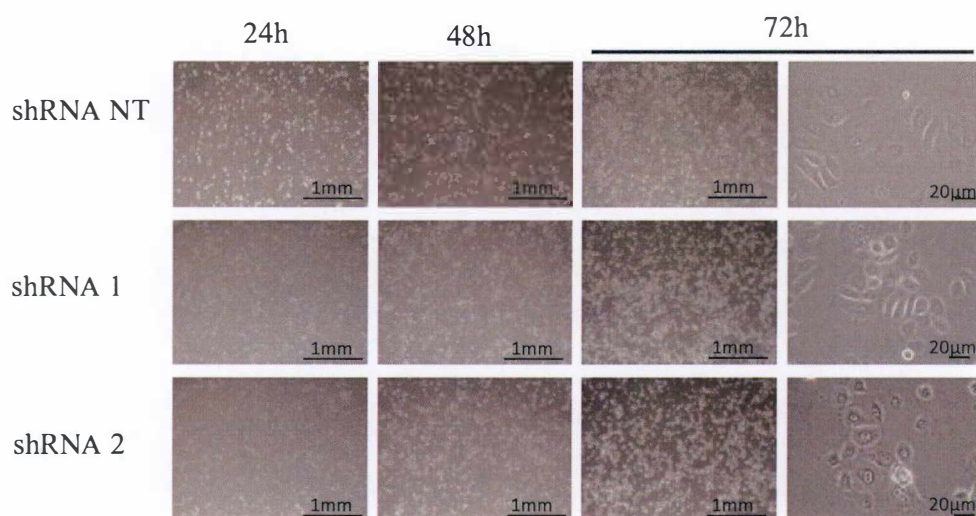


Figure 10 : Suivi de la morphologie des kératinocytes après ensemencement et infection.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sont ensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome des kératinocytes sont utilisées comme contrôle. La morphologie des 3 conditions est observée à 24, 48 et 72h après ensemencement et infection des kératinocytes. Barre d'échelle = 1mm et 20µm.

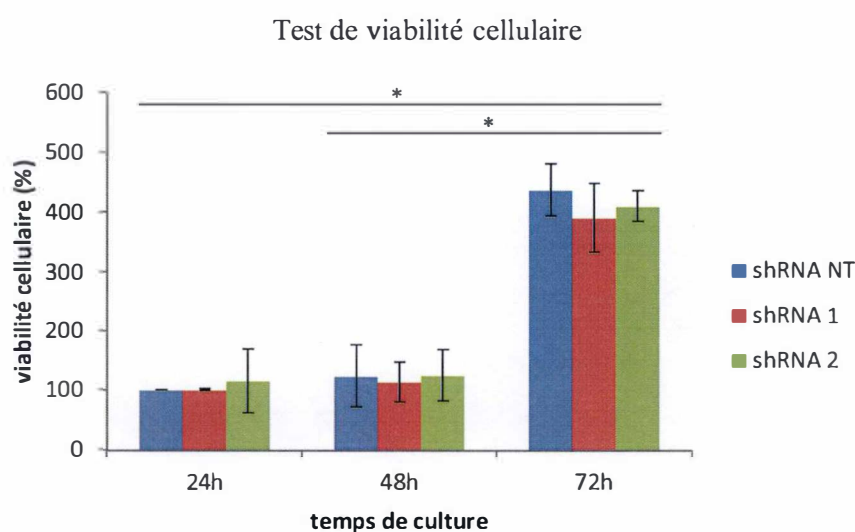


Figure 11 : Viabilité des kératinocytes à 3 temps (24, 48 et 72h) après ensemencement et infection.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sont ensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome des kératinocytes sont utilisées comme contrôle. La viabilité cellulaire de ces 3 conditions est étudiée à 24, 48 et 72h après l'ensemencement et l'infection des kératinocytes. Cette viabilité est exprimée en pourcent et les kératinocytes infectés par des particules virales non-target (NT) deux jours 24h après l'infection représentent le pourcentage de viabilité de référence (100%). Cette expérience a été réalisée en triplicat. Une ANOVA 2 est utilisée avec un intervalle de confiance de 95% (* = $p < 0,05$).

exprimés après la confluence. Dès lors, le phénotype particulier des kératinocytes pourrait être lié à ces changements des marqueurs de différenciation.

2.3. Suivi de l'infection : morphologie et viabilité des kératinocytes

Lorsque les kératinocytes sont infectés par des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1, diverses modifications de l'expression des marqueurs de différenciation sont observées. De plus, un nombre limité de cellules semble proliférer. Afin de mieux comprendre ces phénomènes, une approche intéressante est d'étudier la morphologie des kératinocytes et leur nombre juste après leur infection.

Pour répondre à cela, un suivi de l'infection est réalisé [figure 1C]. Les kératinocytes humains issus d'abdominoplastie sont ensemencés dans une boîte de culture contenant du milieu favorisant leur adhésion et leur prolifération. Lorsque les cellules atteignent 60 à 70% de confluence, celles-ci sont trypsinisées. Les kératinocytes sont ensuite ensemencés dans plusieurs boîtes individuelles en présence de différents types de particules virales (des particules virales exprimant des shRNA NT et des particules exprimant des shRNA qui cible l'ARNm de HYAL1). Ces boîtes individuelles permettent d'étudier les kératinocytes 24h après leur infection, soit juste avant de procéder à la sélection puromycine, à 48h et à 72h. Le suivi de l'infection s'arrête à 72h post-infection car il s'agit du jour où les cellules atteignent 60-70% de confluence et qui correspond donc à la deuxième trypsinisation dans le cas d'une culture de base (cf figure 1B). Les cultures de cellules infectées avec des lentivirus exprimant des shRNA NT peuvent être comparées aux cultures cellulaires infectées par des lentivirus exprimant les shRNA 1 ou 2.

La morphologie des cellules infectées est observée aux trois temps post-infection (24h, 48h et 72h). Le nombre de cellules apparaît plus ou moins identique pour les cellules infectées par des shRNA NT et pour les cultures infectées par les shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1 (shRNA 1 et 2). Bien que le nombre de cellules soit similaire, les cellules infectées par des shRNA 1 ou 2 montrent une morphologie un peu particulière [figure 10]. En effet, celles-ci apparaissent plus rondes et montrent un noyau plus prononcé.

Comme précédemment, un test de viabilité est réalisé pour vérifier si l'infection ne provoque pas de mort cellulaire. Les cultures cellulaires infectées par les 3 types de shRNA (NT, 1 et 2) sont arrêtées à 24h après ensemencement et infection (avant la sélection puromycine), à 48h et à 72h.

À 24h et 48h après ensemencement et infection, le pourcentage de cellules vivantes est quasiment identique entre les cultures infectées par des shRNA NT et des shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1. À 72h, une très légère diminution du pourcentage de cellules vivantes est observée pour les cultures infectées par des shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1 par rapport à la culture infectée par des shRNA NT. Cela suggère une prolifération moins importante des cellules infectées par des shRNA de type 1 ou 2. En revanche, une augmentation significative de la viabilité cellulaire est observée entre les deux premiers temps (24 et 48h) et 72h après infection [figure 11]. Cet accroissement des trois types de population cellulaire avec le temps met en évidence une très forte prolifération des kératinocytes en culture.

Le pourcentage de cellules vivantes dans les cultures infectées par des shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1 72h après l'infection est relativement proche du pourcentage de cellules vivantes infectées par des shRNA NT. Pourtant lors de l'étude de la viabilité cellulaire deux jours avant la confluence (cf. figure 8), le pourcentage de cellules vivantes infectées par un

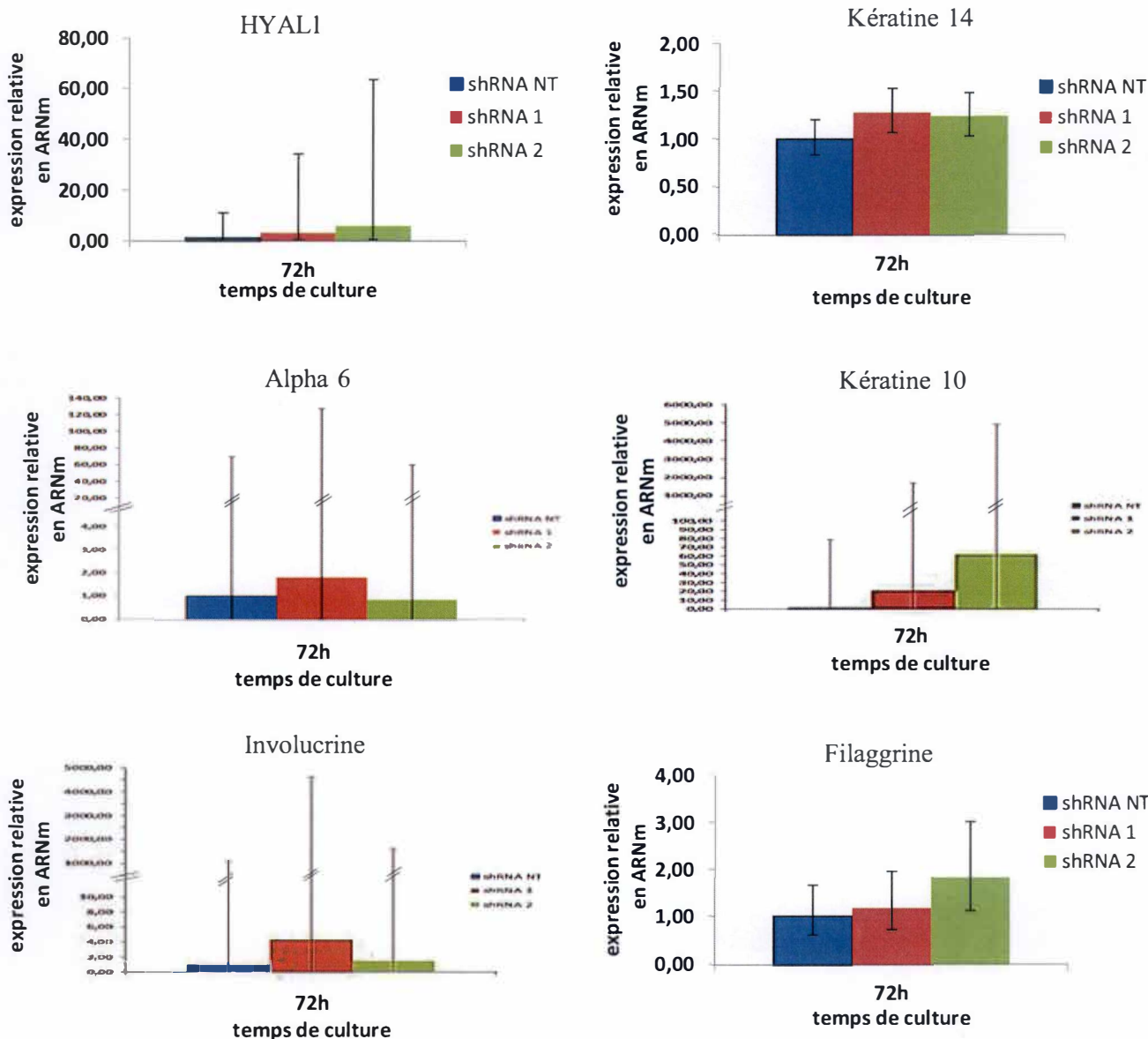


Figure 12 : Expression relative des ARNm de marqueurs de différenciation dans des kératinocytes 72h après ensemencement et infection.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sont ensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome des kératinocytes sont utilisées comme contrôle. Les ARN des kératinocytes des 3 conditions sont extraits 72 heures après l'ensemencement et l'infection des kératinocytes. Les ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire avant d'être analysés par qPCR. Les niveaux d'expression des gènes HYAL1, kératine 10, kératine 14, involucrine, filaggrine et la sous-unité d'intégrine alpha 6 ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène de référence (RPLP0). L'expression en ARNm de la condition non-target (shRNA NT) a été définie comme valeur égale à 1. L'expérience a été réalisée en triplicat. Une *ANOVA 1 Repeated Measures* a été réalisée sur l'ensemble des ΔCq avec un intervalle de confiance de 95% (non significatif).

shRNA qui cible l'ARNm de HYAL1 est très nettement inférieur à celui observé pour les cellules infectées par des shRNA NT. Dès lors, la trypsinisation pourrait avoir un impact sur l'adhérence des cellules lors de leur deuxième ensemencement. Dans le cas où la trypsinisation aurait un effet sur l'adhérence des cellules, une différence en termes d'expression de HYAL1 ou des marqueurs de différenciation pourrait également être observée.

2.4. Expression relative de HYAL1 et de marqueurs de différenciation 72h post-infection

L'expression de HYAL1 et de divers marqueurs de différenciation a aussi été mesurée 72h après ensemencement et infection des kératinocytes. Ce temps correspond au jour où les kératinocytes sont trypsinisés pour être ensemencés en monocouche.

Les cellules sont cultivées en monocouche en conditions autocrines comme expliqué à la figure 1C. Les cultures de cellules infectées par les trois types de shRNA (NT, 1 et 2) sont arrêtées à 72h après ensemencement et infection en boîte individuelle. Les ARN totaux de chaque condition sont extraits, rétro-transcrits en ADN complémentaire puis amplifiés et analysés par PCR en temps réel. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène de référence RPLP0 [figure 12].

Les cultures infectées par des shRNA NT représentent les conditions contrôles et donc les cultures de référence. HYAL1 montre un niveau d'expression relative plus important dans les cultures infectées par des shRNA qui ciblent le transcrite de HYAL1 que dans la culture infectée par des shRNA NT. Cependant, cette observation n'est pas statistiquement significative au vu de la grande variabilité des réplicats, Ce résultat est cohérent avec le résultat obtenu à la figure 9 et témoigne que l'expression HYAL1 n'est effectivement pas inhibée.

L'expression des ARNm de divers marqueurs de différenciation basaux, précoces et tardifs est également mesurée 72h post-infection.

Dans ces conditions, les cultures infectées par les shRNA NT et les cultures infectées par les shRNA qui ciblent l'ARNm de HYAL1 expriment toutes la kératine 14 et la sous-unité d'intégrine alpha 6 (marqueurs basaux). Ces gènes sont exprimés à un niveau légèrement plus élevé dans les cultures infectées par les shRNA 1 ou 2, mais cette différence est non significative. L'expression relative de la kératine 10 (marqueur précoce), d'involucrine et de filaggrine (deux marqueurs tardifs) est un peu plus importante dans les cultures infectées par des shRNA qui ciblent HYAL1, que dans la culture infectée par des shRNA NT. Cependant aucune des différences d'expression observées n'est significative en raison de la très grande variabilité qui existe entre les réplicats. Cette variabilité peut être expliquée par le nombre très réduit de cellules.

2.5. Activité enzymatique de HYAL1 72h post-infection

Bien que l'ARNm de HYAL1 soit exprimé, il est possible que l'enzyme ne soit pas pour autant active. C'est pourquoi, l'activité enzymatique de HYAL1 a été mesurée par zymographie dans les cultures infectées par des shRNA NT et des shRNA qui ciblent le transcrite de HYAL1, 72h post-infection.

Les protéines des kératinocytes cultivés en monocouche jusqu'à 72h après ensemencement et infection sont extraites. L'activité enzymatique des protéines est étudiée par zymographie, comme précédemment [figure 13]. Les bandes blanches sont très peu visibles ; cela est dû à la très faible quantité de matériel présent. HYAL1 apparaît néanmoins active dans les cultures

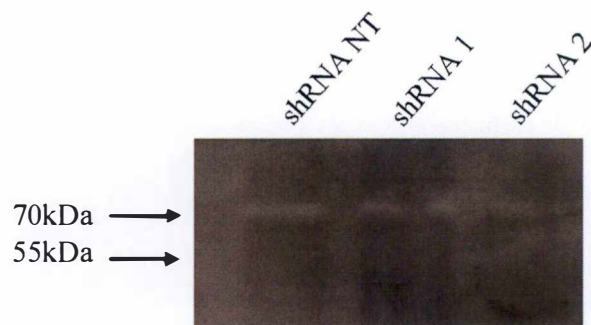


Figure 13 : Activité enzymatique de HYAL1 72h après ensemencement et infection.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1 sont ensemencées avec les kératinocytes. Des particules virales exprimant 2 types de shRNA (1 et 2) sont utilisés. Les particules virales exprimant un shRNA non-target (NT) qui ne possède aucune cible dans le génome des kératinocytes sont utilisées comme contrôle. Les protéines des kératinocytes des 3 conditions ont été extraites 72 heures après l'ensemencement et l'infection. Les protéines migrent sur un gel d'électrophorèse contenant de l'acide hyaluronique. Après incubation du gel au pH optimum de HYAL1, celui-ci est coloré avec du Stainsall 0,01%. Les bandes blanches qui apparaissent correspondent aux zones où l'acide hyaluronique présent dans le gel a été dégradé.

infectées par des shRNA NT (culture considérée comme contrôle) mais aussi dans les cultures infectées par des shRNA qui ciblent le transcrit de HYAL1. Ce résultat est cohérent avec ce qui a été observé pour l'expression d'ARNm. Cependant, cette étude n'a été réalisée qu'une seule fois (n=1), il serait donc intéressant de répéter cette expérience afin d'obtenir des résultats plus pertinents.

L'expression d'HYAL1 n'étant pas inhibée par l'infection des particules virales, une autre approche d'inhibition de HYAL1 a été testée.

3. Étude d'une inhibition de l'activité de HYAL1 dans les kératinocytes humains cultivés en monocouche à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique

Outre l'infection des kératinocytes par des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrit de HYAL1, un inhibiteur pharmacologique peut aussi être utilisé pour inhiber HYAL1 dans les kératinocytes et *in fine* en étudier le rôle. L'acide O-Palmitoyl-L-ascorbique (OPAA) est une molécule pharmacologique réputée pour inhiber l'activité enzymatique de HYAL1 (Olgen, Kaessler, Nebioğlu, & Jose, 2007). Étant donné les difficultés d'inactivation de HYAL1 par la méthode 'lentivirus', cette approche d'inhibition par molécule pharmacologique a été testée.

3.1. Viabilité des kératinocytes après incubation avec l'inhibiteur pharmacologique

Les kératinocytes humains prolifèrent dans un milieu de culture jusqu'à atteindre 60 à 70% de confluence. Ils sont alors trypsinisés etensemencés dans des boîtes avec un nouveau milieu de culture. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. C'est lorsque les cellules atteignent la confluence que l'inhibiteur pharmacologique est ajouté au milieu. Différentes concentrations de l'inhibiteur ont été testées : 1µM, 5µM, 10µM, 25µM et 50µM de manière à trouver la concentration la plus efficace et la moins toxique pour les kératinocytes. Aussi, une boîte de culture ne reçoit que le milieu habituel et est utilisée comme contrôle (CTL) et une boîte de culture reçoit uniquement du DMSO et représente donc le contrôle DMSO (CTL DMSO). Après 48h d'incubation des kératinocytes avec la molécule, les cultures sont arrêtées.

Afin de connaître le seuil de toxicité de la molécule, un test de viabilité cellulaire est réalisé. Les cultures cellulaires sont arrêtées 48h après l'incubation de la drogue et un test MTT est réalisé.

Le pourcentage de cellules vivantes dans les cultures contrôles et les cultures incubées avec 1, 5 et 10µM est comparable. C'est au-delà d'une concentration de 10µM d'OPAA que le pourcentage de cellules vivantes commence à chuter [figure 14]. Cette tendance à la diminution de la population cellulaire suggère une mort des cellules plus importante lorsque la concentration en OPAA augmente. Cependant ce résultat n'est pas significatif en termes statistiques.

3.2. Activité enzymatique de HYAL1 après incubation avec l'inhibiteur pharmacologique

L'acide O-palmitoyl-L-ascorbique (OPAA) est un inhibiteur pharmacologique de l'activité enzymatique de HYAL1. Celui-ci est incubé avec les cellules déjà confluentes. Cette molécule ne modifie pas l'expression de l'ARNm de HYAL1 comme c'est le cas des particules virales qui entrent dans le génome des kératinocytes pour le modifier de manière stable. En effet, l'OPAA cible la protéine de HYAL1 pour inhiber directement son activité

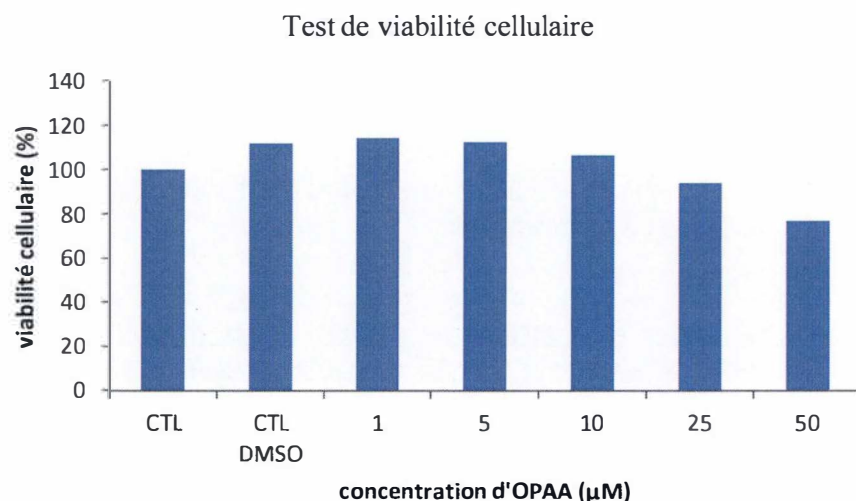


Figure 14 : Viabilité des kératinocytes 48h après incubation d'acide O-Palmitoyl-L-ascorbique.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, une molécule pharmacologique (OPAA) est incubée dans les cultures cellulaires lorsque les kératinocytes atteignent la confluence. Différentes concentrations d'OPAA sont incubées avec les cellules : 1, 5, 10, 25, 50 μM d'OPAA diluée(s) dans un co-solvant (le DMSO). Deux contrôles sont utilisés : un contrôle 'DMSO' (50 μM de DMSO sans OPAA) ainsi qu'une culture n'ayant pas reçu la molécule et le co-solvant. La viabilité cellulaire de ces 7 conditions est étudiée 48h après l'incubation des kératinocytes avec la molécule pharmacologique. Cette viabilité est exprimée en pourcent et les kératinocytes de la condition contrôle représentent le pourcentage de viabilité de référence (100%). Cette expérience a été réalisée en duplicat (pas de test statistique).

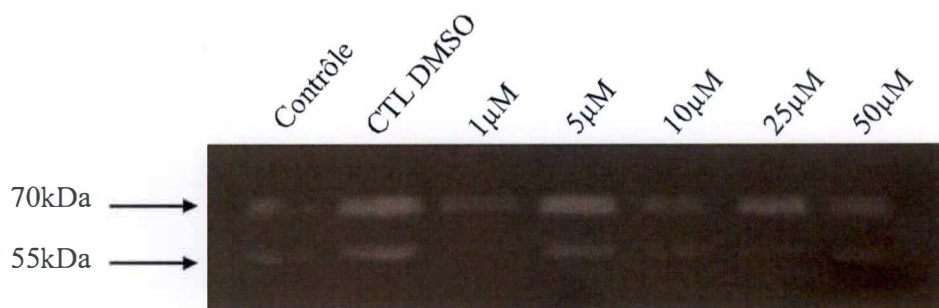


Figure 15 : Activité enzymatique de HYAL1 48h après incubation d'acide O-Palmitoyl-L-ascorbique.

Afin d'inactiver HYAL1 dans des kératinocytes humains, une molécule pharmacologique (OPAA) est incubée dans les cultures cellulaires lorsque les kératinocytes atteignent la confluence. Différentes concentrations d'OPAA sont incubées avec les cellules : 1, 5, 10, 25, 50 μM d'OPAA diluée(s) dans un co-solvant (le DMSO). Deux contrôles sont utilisés : un contrôle 'DMSO' (50 μM de DMSO sans OPAA) ainsi qu'une culture n'ayant pas reçu la molécule et le co-solvant. Les protéines des kératinocytes des 7 conditions ont été extraites 48 heures après l'incubation des kératinocytes avec la molécule pharmacologique. Les protéines migrent sur un gel d'électrophorèse contenant de l'acide hyaluronique. Après incubation du gel au pH optimum de HYAL1, celui-ci est coloré avec du Stainsall 0,01%. Les bandes blanches qui apparaissent correspondent aux zones où l'acide hyaluronique présent dans le gel a été dégradé.

enzymatique. L'étude de l'efficacité de cette drogue passe donc par l'étude de l'activité enzymatique de HYAL1.

Après 48h d'incubation avec la drogue, les cultures de kératinocytes sont arrêtées et les protéines sont extraites. L'activité enzymatique est ensuite étudiée par zymographie [figure 15]. L'activité enzymatique de HYAL1 apparaît dans chacune des conditions, de la plus faible concentration à la plus forte. En présence d'OPAA, HYAL1 est donc toujours active dans les kératinocytes.

En conclusion, il a été montré que HYAL1 était bien présente et active dans les épidermes. De plus, sa localisation spécifique au niveau de la couche granuleuse a été mise en évidence. L'utilisation de ce modèle semblait donc adéquate pour l'étude d'une déficience en HYAL1. Cependant, la reconstruction d'épidermes déficients en HYAL1 s'est avérée impossible. D'autres parts, l'inhibition de HYAL1 dans des cultures en monocouche ne s'est pas montrée plus efficace. Enfin, une tentative d'inactivation de HYAL1 par méthode pharmacologique a été réalisée mais les résultats sont apparus tout autant infructueux que l'inhibition de HYAL1 par lentivirus.

Dès lors, des études *in vivo* représentent une bonne alternative pour l'étude de HYAL1.

B. Résultats *IN VIVO*

La souris déficiente en Hyal1 (Hyal1^{-/-}) a été générée en 2008 (Martin et al., 2008). Cette souris Hyal1^{-/-} est viable, fertile et ne montre pas d'anomalies évidentes. L'équipe de recherche de Barbara Triggs a étudié cette souris plus en détails. Tout d'abord, une accumulation d'acide hyaluronique a été découverte au niveau des articulations, conséquence du rapide renouvellement physiologique de l'acide hyaluronique dans les articulations. Une augmentation d'acide hyaluronique a également été mise en évidence dans la circulation sanguine. La déficience en Hyal1 a également un impact sur la folliculogenèse. Cependant aucune modification de la peau et plus précisément de l'épiderme n'a été détectée et la barrière épidermique apparaît normale.

Malgré l'absence de phénotype épidermique observé dans les précédentes recherches, la souris déficiente en Hyal1 a été étudiée dans le cadre de ce projet.

1. Morphologie et distribution de marqueurs de différenciation et de l'acide hyaluronique dans l'épiderme de souris

Dans un premier temps, des sections de peaux provenant de l'abdomen, de la queue et des oreilles de souris ont été prélevées, fixées et une étude histologique a été réalisée. Une coloration hémalum – érythrosine – safran (HES) a permis de visualiser la morphologie des différentes biopsies. L'hémalum colore en bleu les noyaux, l'érythrosine colore en rose-rouge le cytoplasme des cellules et le safran colore en jaune les fibres conjonctives (résultat non présenté). Parmi les trois sections de peau, l'épiderme provenant des oreilles a été choisi pour les expériences ultérieures. En effet, les sections d'abdomen possèdent beaucoup de follicules pileux rendant le prélèvement relativement fragile et les structures difficilement identifiées. L'épaisseur des épidermes provenant de la queue des souris est, quant à lui, fonction de la localisation du prélèvement. Cette forte variabilité rend les comparaisons de prélèvements malaisées.

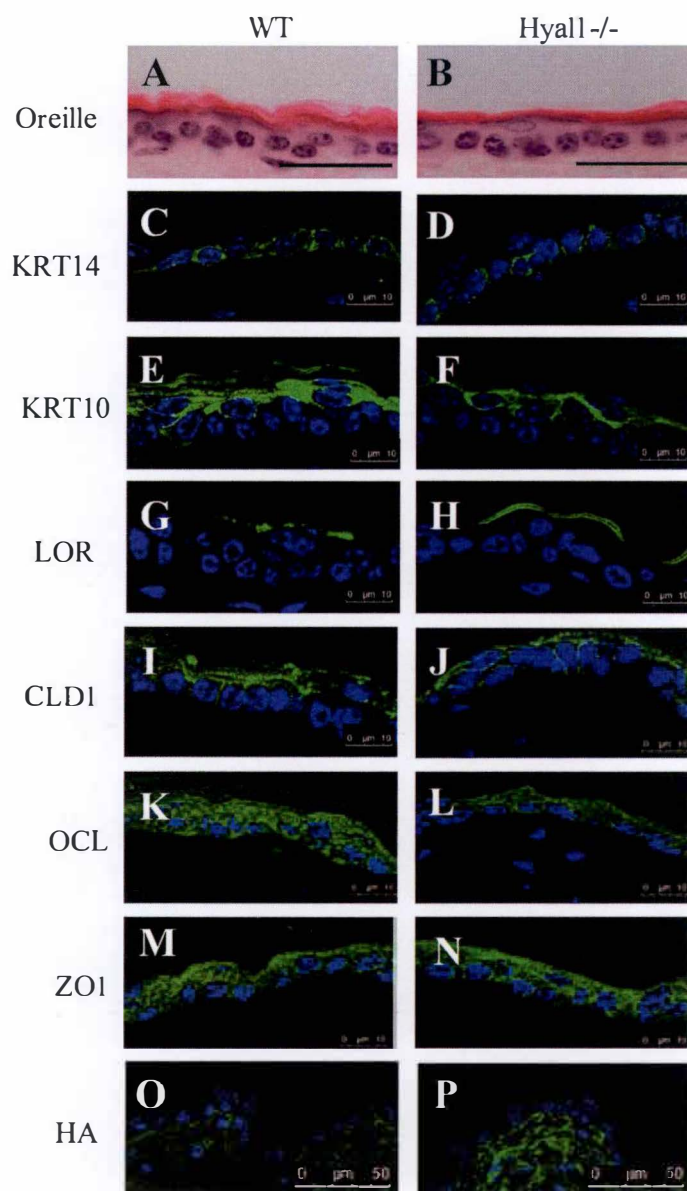


Figure 16 : Morphologie et distribution des marqueurs de différenciation et de l'acide hyaluronique dans l'épiderme de souris.

Des sections d'épidermes provenant d'oreilles de souris adultes ont été fixées et enrobées en paraffine. Les figures de gauche ont été réalisées à partir de souris sauvages (WT) et les figures de droite représentent la même section d'une souris déficiente en Hyal1 (Hyal1^{-/-}). **Figures A et B** : Une coloration hemalun (colore en bleu les noyaux), érythrosine (colore en rouge le cytoplasme) et safran (colore en jaune les fibres conjonctives) a été réalisée. Les différentes couches de la peau peuvent être différenciées et la couche cornée apparaît en rouge au niveau superficiel. Barre d'échelle = 25µm. **Figures C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et N** : Après enrobage en paraffine, une immunohistochimie a été réalisée à l'aide d'anticorps Alexa 488 afin de marquer en vert les marqueurs de différenciation épidermique kératine 14 (KRT14), kératine 10 (KRT10), loritrine (LOR), claudine 1 (CLD1), occludine (OCL) et zona occludens (ZO-1). Les noyaux sont colorés à l'aide du Hoechst 33258 (bleu). Barre d'échelle = 10µm. **Figures O et P** : une HABP lie spécifiquement l'acide hyaluronique. Cette HABP est une protéine biotinylée qui possède de fortes capacités de liaison avec le hyaluronan. La biotine de l'HABP est reconnue et liée par une streptavidine verte. Les noyaux sont colorés à l'aide du Hoechst 33258 (bleu). Barre d'échelle = 50µm.

L'épiderme de souris apparaît plus fin que l'épiderme humain. Dès lors, les différentes strates épidermiques ne sont pas clairement distinguables [figure 16A et B]. Par contre, la morphologie des épidermes provenant de souris sauvages (WT) et de souris déficientes en Hyal1 (Hyal1^{-/-}) apparaissent similaires. Bien que plus fines, les différentes couches d'un épiderme sont visibles au niveau des oreilles des deux types de souris : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée.

La distribution de plusieurs marqueurs de différenciation et de jonctions serrées a également été comparée. Pour ce faire, un marquage immuno-histochimique a été réalisé. Un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome vert sont utilisés pour localiser les marqueurs de différenciation et de jonctions. À nouveau, l'ADN des noyaux est coloré en bleu à l'aide du Hoechst 33258 [figures 16 C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et N]. Dans l'épiderme des souris sauvages comme dans l'épiderme des souris déficientes en Hyal1, la kératine 14 apparaît au niveau de la couche basale de l'épiderme, le marquage de la kératine 10 est présent dans les couches supra-basales et la loricrine est marquée au niveau de la couche cornée. De même, le marquage des protéines de jonctions serrées (claudine 1, occludine et *zona occludens*) est identique dans les épidermes de souris sauvages et les épidermes de souris déficientes en Hyal1. Ce résultat confirme que la morphologie des épidermes de souris sauvages et de souris déficientes en Hyal1 est identique.

Étant donné que Hyal1 est activement impliqué dans la dégradation de l'acide hyaluronique, la distribution de ce dernier est comparée entre les peaux des souris sauvages et celles des souris déficientes en Hyal1 [figure 16 O et P]. Les sections de peaux provenant des souris sauvages et Hyal1^{-/-} sont marquées par l'HABP (Hyaluronic Acid Binding Protein). Le marquage apparaît au niveau du derme mais n'est pas visible dans l'épiderme. Une plus grande quantité d'acide hyaluronique est observée dans le derme des souris déficientes en Hyal1 par rapport au derme des souris sauvages.

Il est intéressant de constater que malgré l'absence de différences morphologiques, la distribution de l'acide hyaluronique dans la peau des souris révèle des différences intéressantes.

2. Dosage de l'acide hyaluronique présent dans la couche cornée

Le marquage de l'acide hyaluronique dans la peau des souris n'étant aisément visible que dans le derme, des questions subsistent sur de possibles différences de concentration en acide hyaluronique dans l'épiderme. En effet, une hypothèse quant au rôle de Hyal1 dans l'épiderme serait un rôle de dégradation de l'acide hyaluronique en molécules de bas poids moléculaires. Ces fragments seraient alors présents dans les couches supérieures de l'épiderme et notamment au niveau de la couche cornée où ils joueraient un rôle d'humidification (Sakai, Yasuda, Sayo, Ishikawa, & Inoue, 2000).

Dans le cas où Hyal1 jouerait en effet ce rôle de dégradation, des quantités plus importantes d'acide hyaluronique devraient être trouvées dans les couches supérieures en cas de déficience en Hyal1.

Afin de comparer les concentrations en acide hyaluronique présent dans les couches cornées des épidermes des souris sauvages et des souris déficientes en Hyal1, un dosage de celui-ci a été réalisé. Les épidermes de souriceaux âgés de 3 à 5 jours ont été extraits. Les cornéocytes, formant une couche cornée relativement compacte ont été séparés des kératinocytes des couches inférieures. Après plusieurs lavages, les cornéocytes ont été lyophilisés et incubés

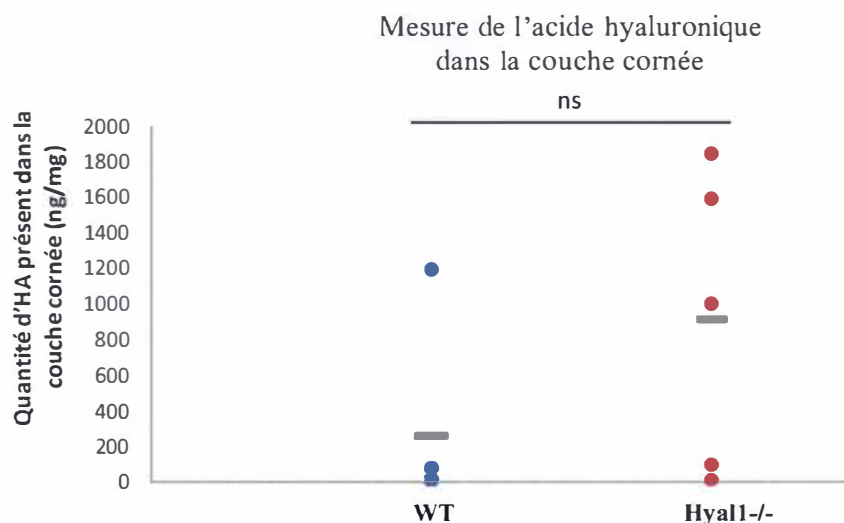


Figure 17 : Quantification de l'acide hyaluronique dans la couche cornée de l'épiderme de souris.

L'acide hyaluronique (HA) a été extrait de la couche cornée de l'épiderme de souris sauvages (WT) et déficientes en Hyal1 (Hyal1^{-/-}). La quantité d'acide hyaluronique (ng) a été mesurée en fonction du poids sec de couches cornées utilisées pour le test. L'expérience a été réalisée sur 5 individus WT et 5 individus Hyal1^{-/-}. Le test statistique utilisé est un *t de student* (ns = non significatif).

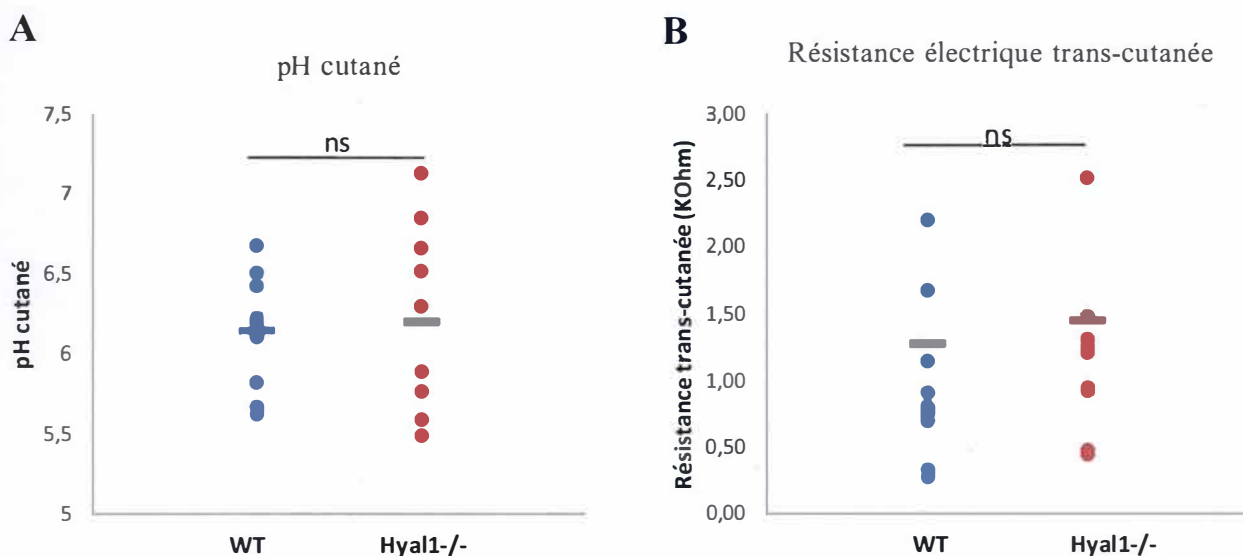


Figure 18 : Mesures du pH cutané et de la résistance électrique trans-cutanée de la peau de souris.

Figure A : Le pH cutané des souris sauvages (WT) et déficientes en Hyal1 (Hyal1^{-/-}) a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Le pH cutané est obtenu par apposition de la sonde du pH-mètre sur la peau du dos des souris. **Figure B :** Les peaux des souris sauvages (WT) et déficientes en Hyal1 (Hyal1^{-/-}) ont été extraites et la différence de potentiel entre deux sondes (une placée au-dessus de la couche cornée et une en-dessous) est mesurée. L'expérience a été réalisée sur 10 individus WT et 10 individus Hyal1^{-/-}. Le test statistique utilisé est un *t de Student* (ns = non significatif).

pendant une semaine dans de la pronase, de manière à digérer l'ensemble des protéines et ne conserver que les sucres. La pronase a ensuite été éliminée et les échantillons ont été dosés par ELISA-like. Cette technique se base sur la reconnaissance et l'affinité de l'aggrécane (HABP) avec l'HA contenu dans les échantillons de couches cornées [figure 17].

La quantité d'acide hyaluronique présent dans la couche cornée des souris sauvages a été comparée à celle détectée dans la couche cornée des souris déficientes en Hyal1. La différence de concentration est statistiquement non-significative. Cependant, une forte tendance à l'augmentation de la concentration en acide hyaluronique dans les couches cornées des souris Hyal1^{-/-} est observée avec une moyenne de 265ng/mg pour les souris sauvages par rapport à une moyenne de 913ng/mg pour les souris déficientes en Hyal1.

3. Mesures du pH cutané et de la résistance électrique trans-cutanée de la peau de souriceaux

D'autres paramètres ont été étudiés au niveau de la peau des souriceaux. Tout d'abord, le pH cutané a été mesuré sur des souriceaux de 3 à 5 jours à l'aide d'un pH-mètre adapté à ce type de mesure. Cette mesure a été réalisée à plusieurs reprises sur des souriceaux sauvages et des souriceaux déficients en Hyal1 [figure 18 A]. Bien que le pH des individus déficients en Hyal1 semble plus variable entre les souriceaux, la valeur moyenne du pH cutané des souriceaux sauvages et déficients en Hyal1 est très similaire, avec un pH aux environs de 6.2.

La résistance électrique trans-cutanée (TEER), exprimée en KOhm, a également été mesurée. Les peaux des souriceaux sauvages et déficients en Hyal1 ont été extraites et montées sur un dispositif. L'appareil de mesure de la résistance trans-cutanée est composé de deux sondes permettant de mesurer une différence de potentiel entre une solution saline (milieu de culture) située au-dessus de la peau et une même solution située en-dessous. Lorsqu'un courant électrique passe à travers une section de peau, une différence de potentiel est observée [figure 18 B]. La valeur moyenne de la résistance trans-cutanée dans les deux groupes de souriceaux est identique.

4. Perméabilité de la barrière épidermique

Les précédents résultats montrent une morphologie et une distribution des marqueurs de différenciation similaires entre les souris sauvages et les souris déficientes en Hyal1. D'autres paramètres tels que le pH cutané ou la résistance électrique trans-cutanée ne montrent pas non plus de différence. Cependant, il a été supposé qu'une certaine disparité peut être plus fine ou transitoire pourrait exister entre les épidermes sauvages et déficients en Hyal1 comme cela a été observé chez les souris déficientes en CD44. En effet, la souris déficiente en CD44, comme la souris Hyal1^{-/-}, apparaissait normale et viable. Cependant, il a été montré que la localisation et la distribution des protéines de jonctions étaient transitoirement altérées lors de la formation de la barrière épidermique (au 17,5^{ème} jour d'embryogenèse). Par contre, au 18,5^{ème} jour d'embryogenèse, la barrière était totalement fonctionnelle (Bourguignon et al., 2006) (Kirschner et al., 2011). Un retard de seulement 1 jour dans la formation de la barrière était observé sans aucune conséquence pour l'intégrité et la fonctionnalité de la barrière.

Un test de perméabilité de la barrière a dès lors été réalisé sur des souris déficientes en Hyal1. Des souris hétérozygotes ont été accouplées de manière à obtenir des embryons sauvages, hétérozygotes et déficients en Hyal1 ayant exactement le même âge. Les embryons sont prélevés au 16.5^{ème} et au 17.5^{ème} jour de gestation. Les queues des embryons sont sectionnées

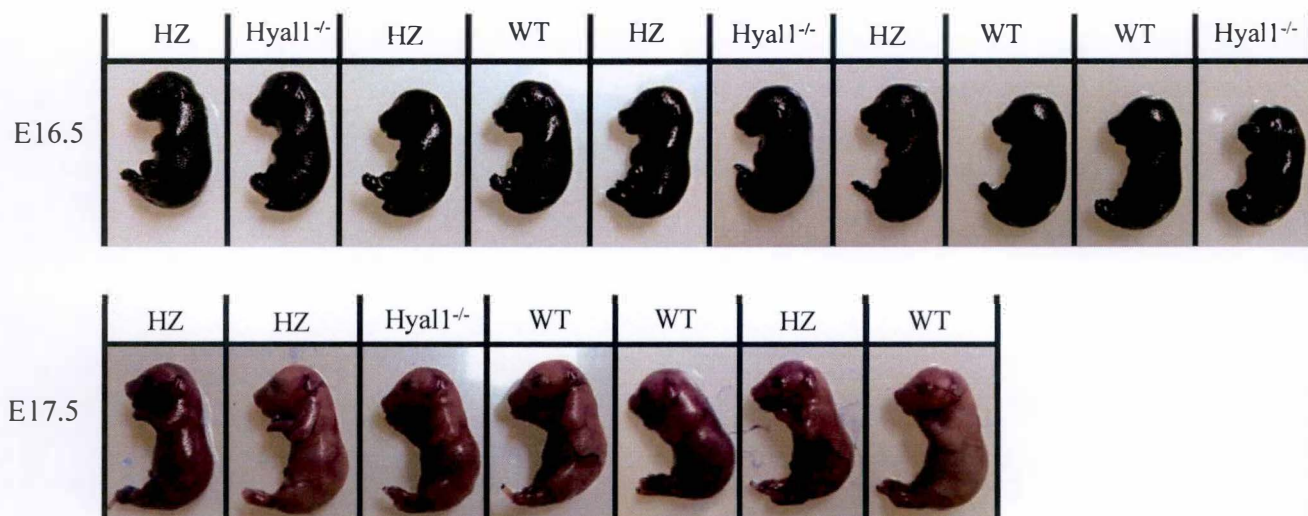


Figure 19 : Test de perméabilité de la barrière épidermique.

Test de perméabilité de la barrière épidermique d'embryons de souris à 16,5 et 17,5 jours de gestation. Après accouplement de souris hétérozygotes (HZ), les embryons prélevés au 16,5^{ème} jour et 17,5^{ème} jour d'embryogenèse sont déshydratés, réhydratés et colorés au bleu de toluidine. Un génotypage permet de déterminer leur fond génique : sauvage (WT), hétérozygote (HZ) ou déficient en Hyal1 (Hyal1^{-/-}).

de manière à réaliser le génotypage et les embryons sont plongés dans un bain de bleu de toluidine [figure 19].

La portée d'embryons prélevés au 16.5^{ème} jour de gestation a donné 10 embryons bleus, qu'ils soient hétérozygotes (4 HZ), sauvages (3 WT) ou déficients en Hyal1 (3 Hyal1^{-/-}). Les embryons sauvages représentent le contrôle interne de l'expérience. À 16.5 jour de gestation, les embryons sont tous bleus ce qui prouve que la barrière n'est pas encore mise en place et que l'épiderme est dès lors toujours perméable comme cela a été démontré dans la littérature (Hardman, Sisi, Banbury, & Byrne, 1998). Au 17.5^{ème} jour de gestation, la portée a donné 7 embryons : 3 hétérozygotes, 3 sauvages et un seul déficient en Hyal1. Quel que soit leur génotype, les sept embryons apparaissent tous blancs, suggérant que la barrière est alors fonctionnelle (Hardman 1998). Aucun retard dans la formation de la barrière n'est donc observé chez les embryons déficients en Hyal1. Cependant, la portée étudiée au 17,5^{ème} jour de gestation ne comprenait qu'un seul embryon Hyal1^{-/-}. Ce test doit donc être recommencé sur de nouvelles portées.

5. Expression relative des ARNm de Hyal1, Hyal2, Hyal3, β -hexosaminidase A et B dans les kératinocytes de souris

Étant donné qu'aucune différence morphologique n'est observée entre les souris sauvages et les souris déficientes en Hyal1, une explication éventuelle pourrait être l'existence d'un système compensatoire. Il a été montré que d'autres enzymes tels que les β -hexosaminidases possédaient une activité redondante avec celle de Hyal1 (Gushulak et al., 2012). Ces enzymes pourraient voir leur expression augmentée en cas de déficience en Hyal1, de manière à conserver le renouvellement de l'acide hyaluronique.

L'expression relative des ARNm de plusieurs hyaluronidases et enzymes possédant une activité similaire a été mesurée. Les kératinocytes des souris sauvages et déficientes en Hyal1 ont été extraits. Les ARN totaux sont extraits et rétro-transcrits en ADN complémentaire. Cet ADN complémentaire est ensuite amplifié par PCR avant d'être analysé par PCR en temps réel. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène de référence GAPDH [figure 20].

L'ARNm des kératinocytes extraits des souris sauvages représente la condition de référence dont la moyenne est fixée arbitrairement à une expression relative de 1. L'expression relative de l'ARNm de Hyal1 des kératinocytes extraits des souris déficientes en Hyal1 est, comme attendu, de 0, avec une différence très hautement significative avec la condition de référence. L'expression de Hyal2 dans les kératinocytes de souris Hyal1^{-/-} est légèrement moins importante que celle de la condition de référence, sans être toutefois significativement différente. L'ARNm de la troisième hyaluronidase (Hyal3) apparaît un peu plus exprimé dans les kératinocytes des souris Hyal1^{-/-}, mais à nouveau cette différence est non significative. Enfin, l'expression relative des deux β -hexosaminidases (A et B) apparaît similaire entre les kératinocytes des souris sauvages et ceux des souris déficientes en Hyal1.

Ces résultats, basés sur l'expression des ARNm, ne révèlent pas de système de compensation de l'expression de la hyaluronidase 1.

Bien que les souris sauvages et déficientes en Hyal1 apparaissent très semblables pour de nombreux paramètres, une différence est tout de même observée en termes de concentration en acide hyaluronique présent dans la couche cornée des épidermes.

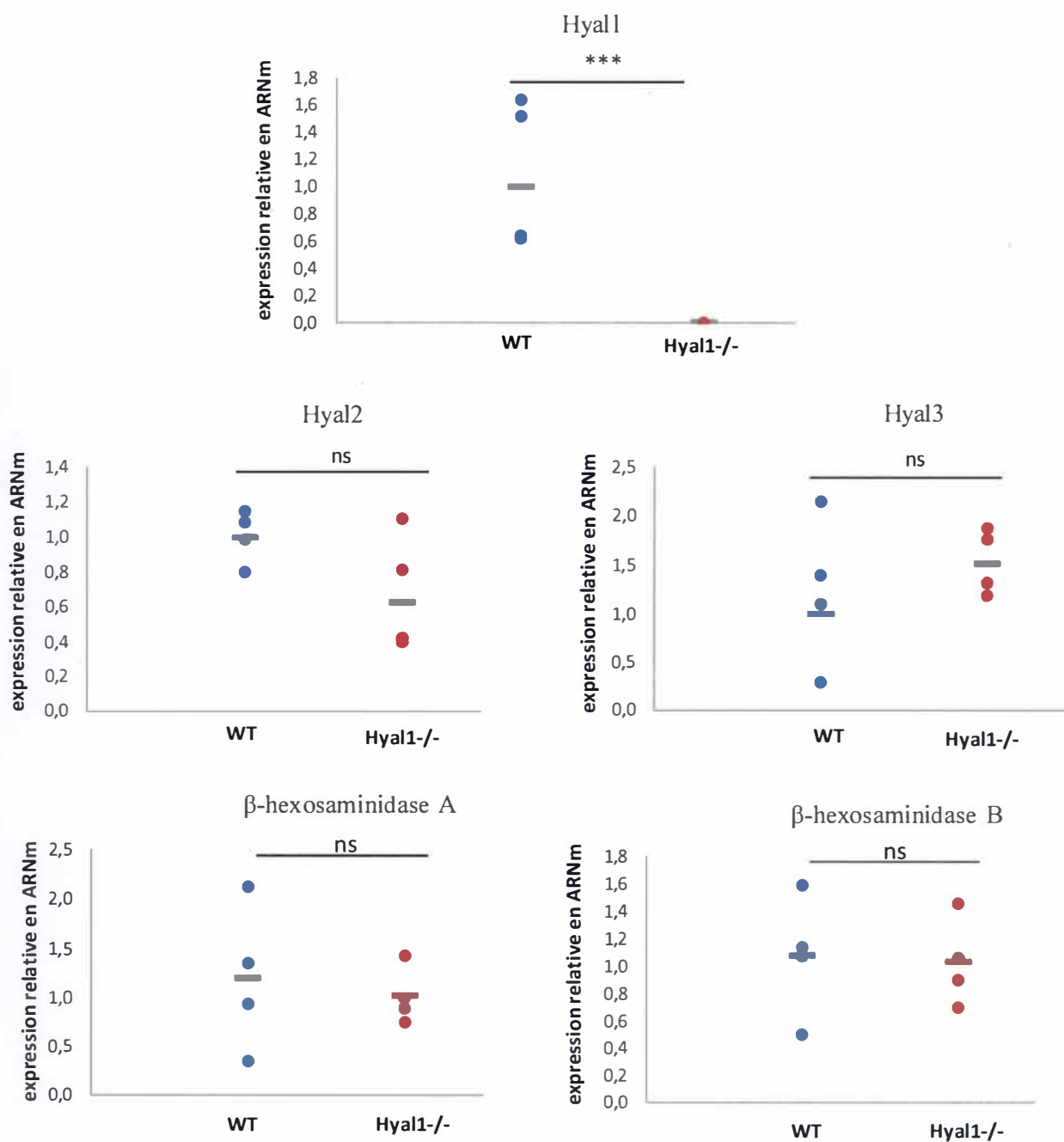


Figure 20 : Expression relative des ARNm de Hyal1, Hyal2, Hyal3, β-hexosaminidase A et B dans l'épiderme de souris.

Les ARN totaux des kératinocytes de souris sauvages (WT) et déficientes en Hyal1 (Hyal1^{-/-}) ont été extraits. Les ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire avant d'être analysés par qPCR. Les niveaux d'expression des gènes Hyal1, Hyal2, Hyal3, β-hex A et B ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène de référence (GAPDH). La moyenne des WT a été défini comme valeur égale à 1. L'expérience a été réalisée sur 4 individus WT et 4 individus Hyal1^{-/-}. Un *t de Student* a été réalisé sur l'ensemble des ΔCq (ns = non significatif / *** = $p < 0,001$).

DISCUSSION & CONCLUSION

Ce projet de recherche a été réalisé dans le contexte de l'étude de l'HA épidermique (thèse de doctorat de Jérémy Malaisse) afin de comprendre plus spécifiquement l'implication éventuelle de Hyal1 dans le métabolisme (dégradation) de l'acide hyaluronique au niveau de ce tissu. Des études *in vitro* et *in vivo* ont été menées de concert de manière à obtenir des données sur du matériel humain (*in vitro*), mais en profitant aussi d'une approche sur animal entier (*in vivo*). D'une part, une inactivation stable de l'expression de HYAL1 dans les kératinocytes humains a été réalisée pour étudier les effets d'une déficience en HYAL1 sur des cellules en monocouche cultivées en conditions autocrines, et dans un épiderme humain reconstruit. Hormis les modifications de la dégradation de l'HA, les capacités de prolifération et de différenciation des kératinocytes ont été étudiées dans ces conditions. D'autre part, les informations apportées par ces modèles *in vitro* ont été complétées par l'étude de l'épiderme de souris déficientes en Hyal1.

1. Caractérisation de HYAL1 dans un épiderme humain

Lors de la reconstruction d'épidermes humains *in vitro*, l'acide hyaluronique apparaît dans les couches de l'épiderme dès le premier jour et se répartit dans le compartiment extracellulaire des couches inférieures durant la reconstruction du tissu. Simultanément, HYAL1 apparaît de façon très spécifique au niveau de la couche granuleuse, lors de son développement, c'est-à-dire au cinquième jour de reconstruction de l'épiderme. Comme il a été observé dans un épiderme humain analysé sur biopsie, aucune co-localisation entre l'acide hyaluronique et HYAL1 n'est détectée. Ces observations suggèrent effectivement la dégradation de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase 1. Cependant, l'absence de détection de HYAL1 à partir de la couche granuleuse n'est pas forcément synonyme de sa disparition totale. En effet, il a été montré que des fragments d'HA de bas poids moléculaires sont présents dans la couche cornée (Sakai et al., 2000), bien que ceux-ci ne puissent pas être détectés par l'HABP lors des analyses histologiques. Dès lors, il convient d'interpréter nos résultats en sachant que les fragments d'acide hyaluronique de bas poids moléculaire ($<4 \times 10^4$ kDa) ne sont pas détectable par l'HABP.

En outre, l'abondance protéique ainsi que l'activité enzymatique de HYAL1 aux différents stades de reconstruction de l'épiderme sont tous les deux stables à partir du premier jour de reconstruction épidermique et jusqu'au onzième jour. Les protéines de HYAL1 sont détectées à 55kDa, qui représente le poids moléculaire spécifique de HYAL1 (Csoka, Frost, & Stern, 2001). De même, l'activité enzymatique de HYAL1 est détectée à 55kDa et 70kDa.

Ces résultats mettent en évidence une discordance entre la distribution de HYAL1 apparaissant au cinquième jour de reconstruction et l'abondance protéique ainsi que l'activité de HYAL1, présentes dès le début de la reconstruction. Cela suggère que la protéine et son activité associée seraient présentes bien avant l'établissement de la couche granuleuse. Ce paradoxe peut être expliqué par l'épaississement de l'épiderme lors de sa formation et par l'importante hétérogénéité des stades de différenciation des kératinocytes durant la reconstruction des différentes couches. En effet, HYAL1 étant présent en très faible quantité durant les premiers jours de la reconstruction, celui-ci n'est pas détectable par les techniques d'immuno-marquage. En revanche, les techniques telles que le Western-Blot et la Zymographie sont capables de détecter les protéines présentes dans l'épiderme en formation. Durant les premiers jours de reconstruction, on peut supposer que HYAL1 se retrouverait 'dilué' dans les couches de l'épiderme. À partir du cinquième jour, la couche granuleuse apparaît et HYAL1 se localise alors spécifiquement et exclusivement au niveau de cette couche. HYAL1 étant alors concentré dans cette seule couche fine, dans un épiderme qui est lui-même composé d'un nombre plus élevé de couches cellulaires, réduisant par conséquent la

proportion (environ 1/5) de cellules dans lesquelles HYAL1 est détectée. Au neuvième jour, l'épiderme est alors composé d'une dizaine d'assises cellulaires parmi lesquelles la couche granuleuse occupe 2 à 3 assises. Avec un rapport proche de 2/10, la proportion de cellules exprimant HYAL1 par rapport à l'ensemble de l'épiderme est donc maintenue. Les résultats obtenus en termes d'abondance protéique et d'activité enzymatique expriment donc une quantité de protéines relative, fonction de l'épaisseur de l'épiderme et des différentes couches spécifiques le caractérisant. En effet, ce concept particulier, lié à l'analyse d'un tissu de culture composé de cellules hétérogènes, vient d'être illustré et discuté dans une publication de notre laboratoire (Malaisse, Hermant, Hayez, 2014).

HYAL1 est donc détecté comme étant une enzyme active dans l'épiderme humain et spécifiquement localisée au niveau de la couche granuleuse. Cependant, la raison d'être exacte de cette enzyme dans l'épiderme n'est pas encore connue. Nous pensions qu'une inhibition d'HYAL1 permettrait de rendre compte de son rôle.

2. Inhibition de HYAL1

Afin d'inhiber l'expression de HYAL1 dans les kératinocytes, des particules virales exprimant des shRNA qui ciblent le transcrite de HYAL1 ont été utilisés. Dans un premier temps, des mises au point impliquant uniquement un passage supplémentaire ou faisant intervenir des shRNA *non-target*, c'est-à-dire qui ne possèdent pas de cible connue dans le génome humain, ont été réalisées sur les épidermes et monocouches. Les résultats ont mis en évidence une morphologie et une localisation de l'acide hyaluronique et de HYAL1 normales dans les épidermes reconstruits. De même, la morphologie des kératinocytes cultivés en monocouches est conforme à ce qui est observé habituellement.

Les épidermes reconstruits infectés par des particules virales exprimant des shRNA *non-target* représentent les contrôles de ce test. L'observation des différentes couches de l'épiderme correctement stratifiées et dont l'épaisseur générale est normale et comparable aux épidermes reconstruits sans infection met en évidence la faisabilité de cette technique. De plus, la génération d'épidermes reconstruits humains infectés par des particules virales vecteurs de shRNA qui ciblent l'ARNm d'un gène particulier a déjà été réalisée. En effet, l'équipe de Michel Simon à Toulouse (Pendaries et al., 2014) a reconstruit des épidermes rendus déficients en filaggrine au moyen de shRNA. Dans ces conditions, un épiderme en trois dimensions a été reproduit, de la couche basale proliférative à la couche cornée fonctionnelle montrant néanmoins une réduction de l'épaisseur. L'étude de l'abondance protéique de la filaggrine a mis en évidence une réduction d'environ 90% de celle-ci par rapport aux épidermes contrôles. Dans notre laboratoire, Aurélie Hayez utilise également cette technique pour inhiber l'expression du gène TMEM45a dans les épidermes reconstruits humains. À nouveau, des épidermes stratifiés sont générés et l'expression relative des ARNm de TMEM45a apparaît fortement diminuée (résultats en cours). Ces études démontrent que l'utilisation de shRNA permet bien une reconstruction d'un épiderme humain déficient pour une protéine particulière.

Cependant, dans les deux types de cultures cellulaires (épidermes reconstruits humains et monocouches) utilisés dans le cadre du projet sur HYAL1, l'infection des kératinocytes par des particules virales exprimant un shRNA qui cible le transcrite de HYAL1 a généré des cultures cellulaires avec un nombre de cellules fortement diminué. Cela a provoqué, d'une part, la reconstruction d'épidermes ne montrant qu'une seule assise cellulaire d'épaisseur, ce qui invalide ce modèle. D'autre part, les kératinocytes cultivés en monocouches n'atteignent pas le stade de confluence, contrairement à leurs homologues contrôles. Les kératinocytes présentent dans ces conditions un phénotype qui semble moins adhérent. La mesure de

l'expression relative de l'ARNm et de l'activité enzymatique de HYAL1 dans les cultures en monocouches montre que cette enzyme de dégradation est présente mais aussi active, mettant en évidence une absence d'inhibition par la méthode des shRNA dans ce cas-ci. Par contre, des variations d'expression des marqueurs de différenciation sont observées, notamment, pour la kératine 10 et la filaggrine.

Le nombre réduit de kératinocytes observés dans les deux types de culture peut être relié à une diminution de l'adhérence des cellules et une différenciation précoce ou partielle de celles-ci. En effet, lorsque les kératinocytes entrent dans le processus de différenciation, ils perdent leur pouvoir prolifératif et les protéines d'adhésion (intégrines) sont moins exprimées (Fortunel & Martin, 2012) (Watt, 1998). HYAL1 étant toujours présent et actif dans les cultures, ce phénomène est difficilement explicable.

De même, l'absence d'inhibition du gène de HYAL1 en culture n'a pas été élucidée. Cependant, parmi les méthodes de transfection existantes, l'utilisation de particules virales (lentivirus dérivé de l'HIV) constitue la technique la plus efficace. En effet, ce type de transfection possède le double avantage d'être stable grâce à l'intégration du vecteur dans le génome des kératinocytes et de permettre une infection efficace des cellules prolifératives ou non. Avec ces propriétés, la transfection des lentivirus supprime les transfections non virales qui présentent une efficacité de seulement 30%, ou encore d'autres méthodes de transfections virales mais ne présentant pas les deux avantages précédemment cités (Chen, Li, Fan, Kasahara, & Woodley, 2003). Dès lors, malgré les problèmes rencontrés pour réprimer HYAL1 dans les kératinocytes humains, cette technique apparaît être la méthode de choix.

Alternativement, l'inactivation d'HYAL1 par un inhibiteur pharmacologique, l'acide O-palmitoyl-L-ascorbique, a été testée (Olgen, Kaessler, Nebioğlu, & Jose, 2007). À nouveau, l'activité enzymatique de HYAL1 est apparue similaire entre les cultures contrôles et les cultures traitées avec l'inhibiteur. Cette molécule pharmacologique ne montre aucun effet sur l'activité de HYAL1.

Lors de l'étude de 2007, cet inhibiteur pharmacologique de HYAL1 avait montré une certaine efficacité. Cependant, il est à noter qu'il s'agissait d'une étude *in vitro*, ne faisant pas intervenir de cellules. Or les cellules pourraient métaboliser la drogue et l'inactiver, par exemple. Autre point important, l'action de l'acide O-palmitoyl-L-ascorbique a été testée sur une hyaluronidase testiculaire bovine, laquelle présente seulement 40% d'homologie avec la hyaluronidase 1 humaine. Ces paramètres peuvent expliquer l'absence d'inhibition de HYAL1 dans des cultures en monocouches de kératinocytes humains.

Les deux techniques d'inhibition de HYAL1 utilisées lors de ce projet n'ayant pas abouti à l'inactivation de cette enzyme, une étude approfondie du rôle de HYAL1 et des conséquences de l'absence de cette enzyme de dégradation de l'acide hyaluronique dans les épidermes n'a pu être réalisée sur base de modèles *in vitro*.

3. Étude de la souris déficiente en Hyal1

L'expérimentation *in vitro* montre quelques limitations dans l'étude d'une déficience en HYAL1. L'inhibition de l'expression de l'enzyme en culture cellulaire par la technique des lentivirus ainsi qu'au moyen d'un inhibiteur pharmacologique ne permet pas cette étude. Afin de pallier ces difficultés, des souris déficientes en Hyal1 ont été étudiées.

Le phénotype des souris déficientes en Hyal1 a déjà été étudié lors de la génération de cette souris transgénique (Martin et al., 2008). Malgré ces premières expériences et la

caractérisation de la souris, la morphologie des souris sauvages et déficientes en Hyal1 a été comparée. Aussi bien la morphologie générale de l'épiderme que les marqueurs de différenciation apparaissent similaires. Bien que ces observations ne montrent pas de différence, la recherche d'une disparité plus subtile a été effectuée. En effet, un retard transitoire de la formation de barrière lors de l'embryogenèse, comme observée chez les souris déficientes en CD44 (Bourguignon et al., 2006), a été recherché. La formation de la barrière entre 16.5 et 17.5 jour de gestation atteste d'une barrière fonctionnelle. Ce test, réalisé une seule fois sur des embryons provenant des parents hétérozygotes, nécessite cependant d'être à nouveau réalisé sur de nouvelles portées afin de confirmer ce résultat.

De même, la mesure du pH cutané impliqué dans le maintien de l'homéostasie de la barrière, ainsi que la mesure de la résistance électrique trans-cutanée ont été réalisées sur des souriceaux de 2-3 jours environ. L'avantage de l'utilisation de souriceaux plutôt que de souris adultes vient du fait que les souriceaux possèdent déjà une barrière fonctionnelle et mature, mais ils ne possèdent pas encore de poils, rendant l'étude de l'épiderme plus aisée et évitant toute interférence avec les mesures réalisées. Les paramètres mesurés apparaissent similaires entre les épidermes de souris sauvages et des souris déficientes en Hyal1. L'absence de Hyal1 au niveau de l'épiderme des souris n'apporte donc pas de modification en termes de barrière, pH ou résistance trans-cutanée.

L'éventualité d'un système potentiel de compensation de l'activité hyaluronidase aurait pu expliquer l'absence de phénotype chez cette souris déficiente en Hyal1, mais notre étude n'a pas montré d'augmentation d'expression relative des ARNm des autres hyaluronidases (Hyal2 et Hyal3) exprimées dans la peau. Certaines de ces hyaluronidases montrent cependant entre elles une corrélation d'expression. En effet, il a été montré que l'activité enzymatique de Hyal1 était en corrélation avec l'expression en ARNm de Hyal3 (Martin et al., 2008). De même, aucune compensation de l'expression de Hyal1 n'a été observée en terme d'ARNm pour les enzymes β -hexosaminidases A et B, connues pour exercer une activité très proche de celle de la hyaluronidase 1 (Gushulak et al., 2012). Cependant, cette étude de la compensation de Hyal1 n'a été étudiée qu'au niveau de l'expression en ARNm. L'expression des ARNm n'est pas le reflet de l'abondance protéique et de l'activité générée par une enzyme. Une compensation de l'activité enzymatique de Hyal1 par une autre enzyme n'est donc pas exclue. Afin de confirmer ou d'infirmer l'absence de mécanismes compensatoires, une étude de l'abondance protéique de Hyal2, Hyal3, β -hexosaminidases A et B complétée par une mesure de l'activité enzymatique serait nécessaire.

Bien que la morphologie des épidermes des souris adultes et divers paramètres étudiés chez les souriceaux et les embryons soient similaires, le marquage de l'acide hyaluronique révèle une plus grande quantité de ce dernier dans le derme des souris déficientes en Hyal1 par comparaison aux souris sauvages. Cela met en exergue que Hyal1 est actif dans le derme des souris sauvages et possède un rôle de dégradation de l'acide hyaluronique. Ce résultat n'est cependant pas quantitatif. Dès lors, pour confirmer que la quantité d'acide hyaluronique augmente dans le derme des souris déficientes en Hyal1, une mesure quantitative de l'HA doit être réalisée. De plus, le marquage de l'acide hyaluronique n'apparaît que dans le derme des souris. L'absence de marquage visible au niveau de l'épiderme peut être liée à la quantité importante d'HA présent au niveau du derme par rapport à l'épiderme. Dès lors, l'acide hyaluronique présent en quantité réduite n'est pas détecté par l'HABP, comme cela avait été montré dans une étude précédente (Mack et al., 2012). D'autre part, dans le cas où les fragments d'HA dans l'épiderme seraient de très faible poids moléculaire, l'HABP ne permettrait pas une détection de celui-ci (Sakai et al., 2000). Afin de fournir les preuves de la présence d'acide hyaluronique dans l'épiderme des souris, un dosage quantitatif de l'acide

hyaluronique présent exclusivement dans la couche cornée a été réalisé. De manière très intéressante, une certaine quantité d'acide hyaluronique a été détectée et mesurée dans la couche cornée des souris sauvages. Au niveau de la couche cornée des souris déficientes en Hyall, une plus grande quantité d'acide hyaluronique est observée, confirmant le rôle de dégradation de l'HA par la hyaluronidase 1 dans l'épiderme des souris sauvages. Il est à noter que ce dosage de l'acide hyaluronique présent dans la couche cornée n'a été réalisé qu'une seule fois sur cinq individus sauvages et cinq individus déficients en Hyall, et que le résultat est statistiquement non significatif. Cependant, au vu de la forte tendance à l'augmentation de la concentration en acide hyaluronique dans les couches cornées des souris déficientes en Hyall, cette expérience doit aussi être reproduite.

L'ensemble de ces résultats souligne que la hyaluronidase 1 est présente et active spécifiquement au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme. Dans un premier temps, il a été suggéré que Hyall jouait un rôle de frontière entre un compartiment hydrophile et un compartiment hydrophobe. En effet, l'acide hyaluronique, molécule hautement hydrophile est responsable de la rétention d'eau au niveau des tissus (Anandagoda, Ezra, Cheema, Bailly, & Brown, 2012). La couche cornée, à l'inverse, est composée de cornéocytes, c'est-à-dire de cellules mortes hydrophobes entourées d'une grande quantité de lipides (Rawlings, Scott, Harding, & Bowser, 1994). La présence d'acide hyaluronique hydrophile dans ce compartiment hydrophobe étant incompatible, Hyall avait été supposé jouer un rôle de « barrière » empêchant le passage de l'acide hyaluronique dans les couches supérieures de l'épiderme.

Cependant, une certaine concentration en acide hyaluronique est mesurée dans la couche cornée des souris sauvages en conditions physiologiques, écartant dès lors l'hypothèse du rôle de « barrière » de Hyall. De plus, une quantité plus importante d'acide hyaluronique est mise en évidence au niveau des couches cornées des souris déficientes en Hyall. Cela signifie que Hyall est responsable de la dégradation d'une portion de l'acide hyaluronique provenant des couches inférieures en molécules de plus petits poids moléculaires. Evidemment, l'absence de détection de l'acide hyaluronique peut s'expliquer par la limite de détection de l'HABP.

La hyaluronidase 1 présente au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme jouerait donc un rôle de dégradation de l'acide hyaluronique en fragments de bas poids moléculaires, lesquels pourraient être simultanément internalisés dans le cytoplasme des kératinocytes. Ces kératinocytes impliqués dans le processus de différenciation 'emmèneraient' les fragments d'acide hyaluronique dans les couches supérieures de l'épiderme et se retrouveraient *in fine* dans les cornéocytes.

De plus, l'augmentation de la sécrétion des hyaluronidases par les kératinocytes observée lors de la différenciation (Frost & Stern, 1997) suggère que l'acide hyaluronique présent dans les couches inférieures de l'épiderme est clivé en fragments de bas poids moléculaires pendant la différenciation des kératinocytes, qui se retrouvent par conséquent dans les cellules de la couche cornée. Bien que le rôle de l'acide hyaluronique dans les couches supérieures de l'épiderme et notamment au niveau de la couche cornée ne soit pas encore connu, la propriété de forte rétention d'eau via l'acide hyaluronique lui confèrerait un rôle d'hydratation jusqu'à la couche la plus superficielle.

L'acide hyaluronique est une molécule très impliquée dans la rétention d'eau et donc potentiellement dans l'hydratation de la couche cornée. Cette hydratation constante de la peau, maintenue par le processus de renouvellement des kératinocytes et des cornéocytes vecteurs de petits fragments d'HA, permettrait d'assurer la flexibilité de la peau et la desquamation des cellules de la couche cornée (Sakai et al., 2000). De plus, il a été mis en évidence que l'acide

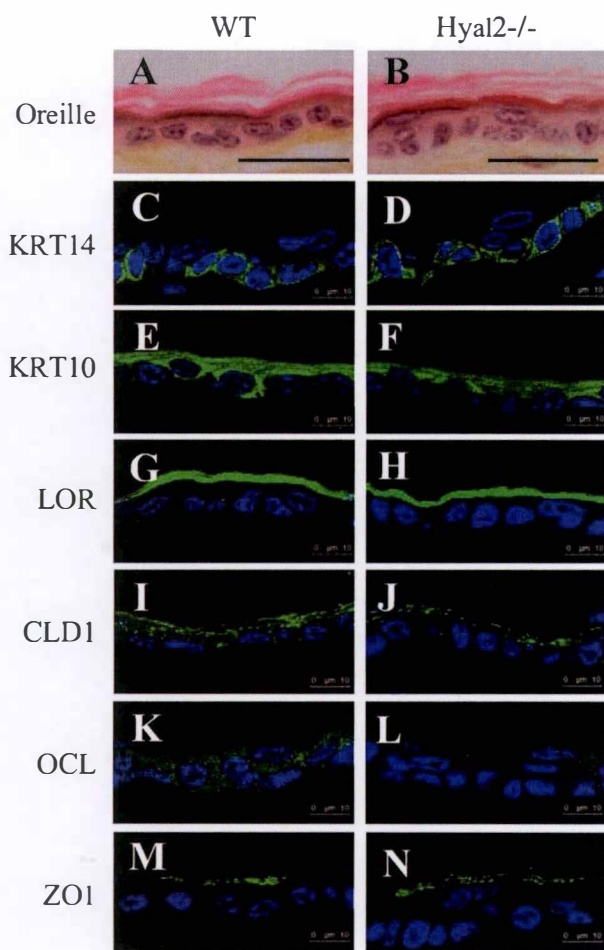


Figure 1 : Morphologie et distribution des marqueurs de différenciation dans l'épiderme de souris.

Des sections d'épidermes provenant d'oreilles de souris adultes ont été fixées et enrobées en paraffine. Les figures de gauche ont été réalisées à partir de souris sauvages (WT) et les figures de droite représentent la même section d'une souris déficiente en Hyal2 (Hyal2^{-/-}). **Figures A et B** : Une coloration hemalun (colore en bleu les noyaux), érythrosine (colore en rouge le cytoplasme) et safran (colore en jaune les fibres conjonctives) a été réalisée. Les différentes couches de la peau peuvent être différenciées et la couche cornée apparait en rouge au niveau superficiel. Barre d'échelle = 25µm.

Figures C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et N : Après enrobage en paraffine, une immunohistologie a été réalisée à l'aide d'anticorps Alexa 488 afin de marquer en vert les marqueurs de différenciation épidermique kératine 14 (KRT14), kératine 10 (KRT10), loricrine (LOR), claudine 1 (CLD1), occludine (OCL) et zona occlusens (ZO-1). Les noyaux sont colorés à l'aide du Hoechst 33258 (bleu). Barre d'échelle = 10µm.

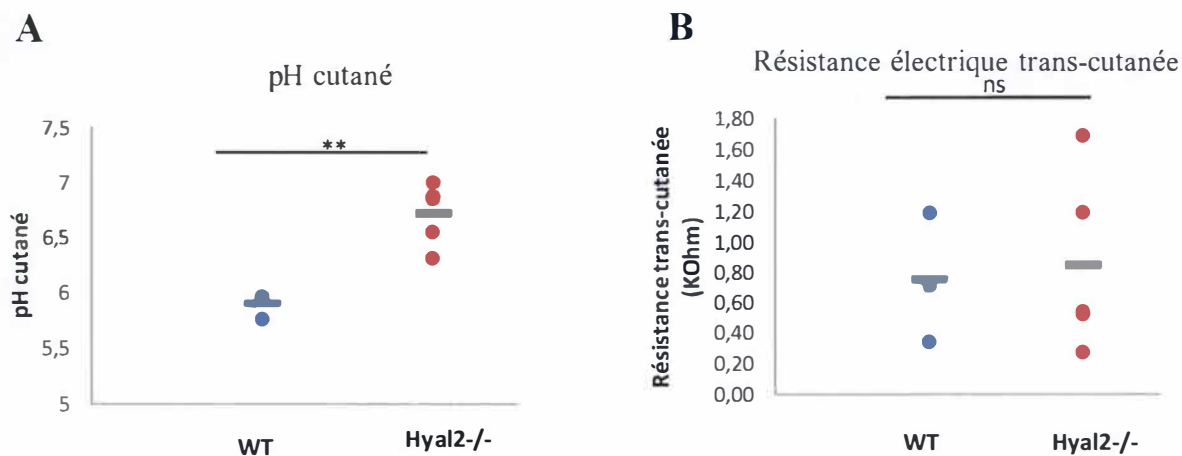


Figure 2 : Mesures du pH cutané et de la résistance électrique trans-cutanée de la peau de souriceaux.

Figure A : Le pH cutané des souriceaux sauvages (WT) et déficients en Hyal2 (Hyal2^{-/-}) a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Le pH cutané est obtenu par apposition de la sonde du pH-mètre sur la peau du dos des souriceaux. **Figure B** : Les peaux des souriceaux sauvages (WT) et déficients en Hyal2 (Hyal2^{-/-}) ont été extraites et la différence de potentiel entre deux sondes (une placée au-dessus de la couche cornée et une en-dessous) est mesurée. L'expérience a été réalisée sur 3 individus WT et 5 individus Hyal2^{-/-}. Le test statistique utilisé est un *t* de Student (ns = non significatif / * = p<0,005).

hyaluronique, malgré ses propriétés hydrophiles, était capable d'interagir avec les lipides contenus dans la couche cornée. Cette interaction pourrait potentiellement avoir un rôle de régulateur mécanique de la couche cornée (Ghosh, Hutadilok, Adam, & Lentini, 1994).

4. Perspective – rôle de Hyal2

Au vu de la collaboration possible qu'il existe entre Hyal1 et Hyal2 dans la dégradation de l'acide hyaluronique (Stern, 2003), une brève caractérisation de souris déficientes en Hyal2 a été réalisée. La souris Hyal2^{-/-} est viable et fertile. La délétion de ce gène provoque une accumulation de l'acide hyaluronique dans le plasma. Néanmoins la quantité d'acide hyaluronique ne semble pas augmentée au niveau des tissus de cette souris. Pourtant, il a été observé que la souris déficiente en Hyal2 possède une espérance de vie plus faible que ses homologues hétérozygotes, mais les souris déficientes en Hyal2 ne montrent pas de phénotype important (Jadin et al., 2008).

Comme lors de l'étude de la souris Hyal1^{-/-}, les peaux des souris déficientes pour Hyal2 montrent des morphologies identiques à celles des souris sauvages. Il en est de même pour l'expression des marqueurs de différenciation tels que la kératine 14, la kératine 10, la loricrine et les marqueurs de jonctions *tight* (occludine, claudine 1 et *zona occludens*) [figure 1]. Les mesures de pH cutané et de résistance électrique trans-cutanée ont également été réalisées [figure 2]. Comme pour les souris déficientes en Hyal1, aucune différence n'est observée entre les souris sauvages et les souris déficientes en Hyal2 en ce qui concerne la résistance trans-cutanée. Par contre, une augmentation très significative du pH cutané des souris déficientes en Hyal2 est observée. Le pH étant impliqué dans l'homéostasie de la barrière et dans la régulation de la desquamation des cellules de la couche cornée (Elias et al., 2003), cette modification importante pourrait provoquer des altérations de la barrière ou d'autres conséquences encore inconnues. De plus, ce test n'a été réalisé que sur 3 individus sauvages et 5 individus déficients en Hyal2. Il serait dès lors nécessaire de reproduire le test.

En plus de ces premières expériences *in vivo*, un marquage de Hyal2 et de l'acide hyaluronique a également été réalisé sur les épidermes reconstruits humains (aux jours 1, 3, 5, etc.) [figure 3]. Hyal2 apparaît dans les couches inférieures de l'épiderme dès le premier jour de reconstruction et se localise en théorie ancré à la membrane plasmique par une ancre GPI (Girish & Kemparaju, 2007). L'acide hyaluronique présent dans les espaces extracellulaires est également visible entre les kératinocytes des couches basales et épineuses. Pour terminer, un co-marquage Hyal1/Hyal2 [figure 4] a été réalisé sur une peau normale humaine. Il est intéressant de constater que Hyal2 et Hyal1 ne co-localisent pas. Cela suggère que l'acide hyaluronique serait dans un premier temps éventuellement dégradé en fragments de 20kDa par Hyal2 dans les couches inférieures de l'épiderme et ces fragments seraient ensuite clivés par Hyal1 au niveau de la couche granuleuse. Cependant, les anticorps qui ciblent Hyal2 ne sont pas encore tout à fait au point et nécessitent des contrôles de leur spécificité.

Ces résultats sur Hyal2 ne sont que préliminaires, mais au vu de l'effet important qu'une déficience en Hyal2 provoque sur le pH cutané et au vu de la séparation très distincte qu'il existe entre Hyal1 et Hyal2, une étude plus approfondie de cette hyaluronidase serait également intéressante.

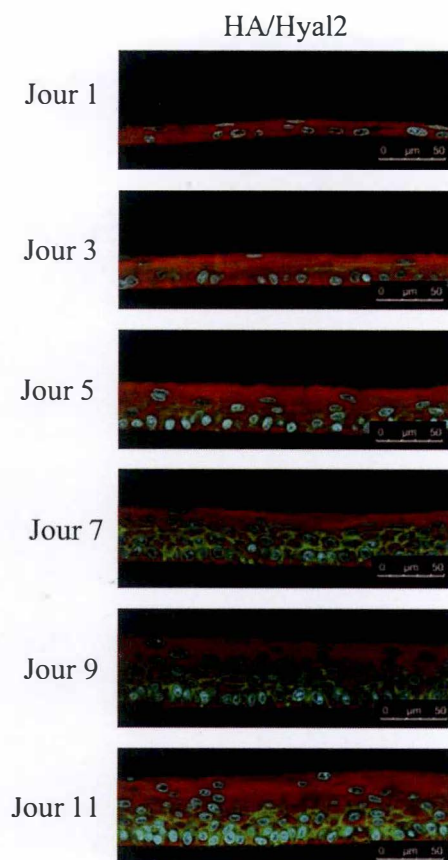


Figure 3 : Distribution de l'acide hyaluronique (HA) et de HYAL2 dans un épiderme reconstruit humain.

Les épidermes reconstruits humains sont obtenus après 1, 3, 5, 7, 9 et 11 jours de reconstruction. Les kératinocytes sontensemencés sur un filtre de polycarbonate et l'interface à l'air est réalisé le premier jour de la reconstruction, soit 24h après l'ensemencement. Les épidermes sont ensuite fixés et une étude histologique est réalisée. Une HAPB lie spécifiquement l'acide hyaluronique. Cette HAPB est une protéine biotinylée qui possède de fortes capacités de liaison avec le hyaluronan. La biotine de l'HABP est reconnue et liée par une streptavidine verte. Un anticorps anti-HYAL2 marque HYAL2 en rouge et les noyaux sont colorés en bleu à l'aide du Hoechst 33258. Barre d'échelle = 50μm.

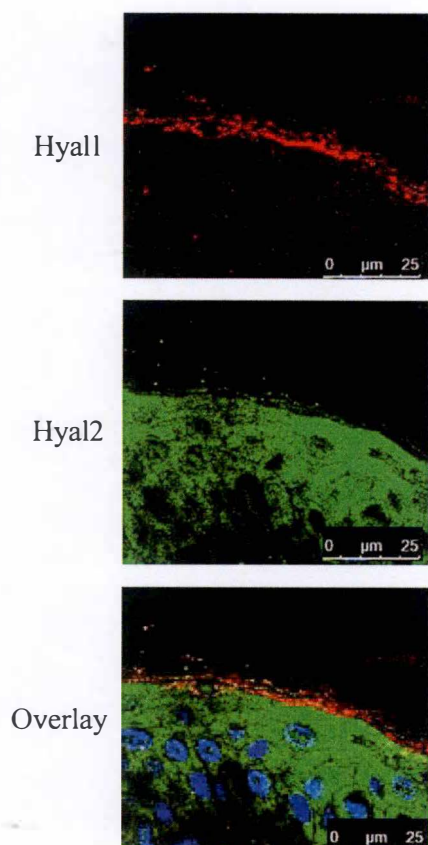


Figure 4 : Marquage de Hyal1 et Hyal2 dans un épiderme normal humain.

L'épiderme normal humain obtenu à la suite d'une abdominoplastie est fixé et une étude histologique est réalisée. Un anticorps anti-Hyal1 marque Hyal1 en rouge et un anticorps anti-Hyal2 marque Hyal2 en vert. Les noyaux sont colorés en bleu à l'aide du Hoechst 33258. Barre d'échelle = 25μm.

De façon générale, l'acide hyaluronique est un glycosaminoglycan caractérisé par un temps de demi-vie très court impliquant un renouvellement de celui-ci très rapide. Alors que la synthèse est assurée par les hyaluronan synthases, l'acide hyaluronique est activement dégradé par les hyaluronidases. Ces deux catégories d'enzymes, de synthèse (HAS) ou de dégradation (Hyal), agissent de façon coordonnée afin de préserver un « réservoir » d'acide hyaluronique constant et physiologique.

L'acide hyaluronique est impliqué dans un grand nombre de fonctions, allant de l'embryogenèse à des phénomènes d'inflammation, immunitaires et cancéreux, en passant par un rôle de régulateur de la prolifération et de la différenciation cellulaires. C'est au niveau de la peau, principalement dans le derme mais de façon non négligeable dans l'épiderme, que la majorité de l'acide hyaluronique contenu dans l'organisme se retrouve.

Notamment, l'étude de la régulation de la prolifération chez le kératinocyte (Rilla, Pasonen-Seppänen, Rieppo, Tammi, & Tammi, 2004) montre qu'il y aurait une corrélation entre la prolifération des kératinocytes et la quantité d'acide hyaluronique. En effet, des facteurs de croissance tel que l'EGF stimulent la production d'acide hyaluronique en activant les hyaluronan synthases 2 et 3, alors que la présence de TGF- β montre un effet opposé en réprimant les HAS2 et 3 (Pasonen-Seppänen et al., 2003). Cependant, ces conclusions sont loin d'être immuables et définitives. Il a récemment été mis en évidence dans notre laboratoire que l'enzyme de synthèse de l'acide hyaluronique responsable de l'augmentation de la concentration en HA observé en culture *in vitro* (monocouches et épidermes humains reconstruits) était la synthase 1, alors que les HAS2 et 3 diminuaient, contrairement aux suppositions proposées. Cependant, HAS3 prendrait le dessus sur HAS1 en conditions inflammatoires, par exemple (Malaisse et al., 2014).

D'autre part, le rôle de l'acide hyaluronique dans le phénomène de différenciation a montré quelques désaccords concernant son explication. Alors que certaines équipes de recherches mettent en évidence une corrélation entre l'acide hyaluronique et l'expression des marqueurs de différenciation (Farwick et al., 2011) (Bourguignon et al., 2006), d'autres études montrent à l'inverse que la dégradation de l'acide hyaluronique n'influe pas sur la différenciation des kératinocytes (Passi et al., 2004) (Maytin, Chung, & Seetharaman, 2004). Enfin, notre équipe a mis en évidence que, lors de la différenciation épidermique, il y a une production d'acide hyaluronique, mais que celle-ci n'est pas directement liée au processus de différenciation (Malaisse et al., 2014).

L'acide hyaluronique ne serait donc pas impliqué dans la différenciation cellulaire, mais par ailleurs les connaissances et conclusions relatives au rôle de l'acide hyaluronique dans la prolifération cellulaire évoluent et sont donc constamment remises en questions.

L'acide hyaluronique, de par ses propriétés de viscoélasticité, est une molécule capable d'une rétention d'eau très importante (Anandagoda et al., 2012). L'HA présent dans la peau en grande quantité confère donc à ce tissu une bonne hydratation. Bien qu'il existe des facteurs tels que les NMF (Natural Moisturization Factor) et les lipides impliqués dans l'hydratation cutanée (Sakai et al., 2000), l'acide hyaluronique pourrait également intervenir dans ce processus. En effet, malgré la présence de Hyal au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme, l'acide hyaluronique n'est pas totalement dégradé et une certaine quantité de celui-ci se retrouve au niveau de la couche cornée.

En conclusion, peu de choses sont réellement connues et définitivement acquises en ce qui concerne l'acide hyaluronique et son rôle, particulièrement dans les épidermes. En effet, au niveau des épidermes, la dégradation de l'acide hyaluronique est constatée au niveau de la

couche granuleuse, mais une certaine quantité de celui-ci subsiste et migre dans les couches supérieures. Dès lors, pas mal de questions se posent quant à l'intérêt physiologique de dégrader cette molécule, mais d'en garder néanmoins de petits fragments.

À l'objectif de base concernant le rôle de HyalI dans les épidermes, nous pouvons dire que HyalI a été caractérisé au niveau de l'épiderme alors que cette enzyme n'avait pratiquement pas été étudiée dans cette région. D'autre part, l'activité de dégradation de l'acide hyaluronique en fragments de petits poids moléculaires migrant jusqu'aux cornéocytes a également été mise en évidence. Quant à expliquer le but de cette dégradation en cet endroit précis, des études ultérieures sont encore nécessaires pour tenter de répondre à cette question.

RÉFÉRENCES

Références

- Anandagoda, N., Ezra, D. G., Cheema, U., Bailly, M., & Brown, R. a. (2012). Hyaluronan hydration generates three-dimensional meso-scale structure in engineered collagen tissues. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 9(75), 2680–7. doi:10.1098/rsif.2012.0164
- Barrandon, Y., & Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Cell Biology*, 84(April), 2302–2306.
- Berger, C. L., Vasquez, J. G., Shofner, J., Mariwalla, K., & Edelson, R. L. (2006). Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(10), 1632–6. doi:10.1016/j.biocel.2006.03.006
- Bergstresser, P. R., & Taylor, J. R. (1977). Epidermal ' turnover time '— a new examination, c.
- Biedermann, T., Pontiggia, L., Böttcher-Haberzeth, S., Tharakan, S., Braziulis, E., Schiestl, C., ... Reichmann, E. (2010). Human eccrine sweat gland cells can reconstitute a stratified epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(8), 1996–2009. doi:10.1038/jid.2010.83
- Boonen, M., Puissant, E., Gilis, F., Flamion, B., & Jadot, M. (2014). Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(4), 1155–60. doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.070
- Bourguignon, L. Y. W., Ramez, M., Gilad, E., Singleton, P. a, Man, M.-Q., Crumrine, D. a, ... Feingold, K. R. (2006). Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(6), 1356–65. doi:10.1038/sj.jid.5700260
- Boyce, S. T., & Ham, R. G. (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. Lou, Calabro, A., ... Mcdonald, J. A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 349–360.
- Chen, M., Li, W., Fan, J., Kasahara, N., & Woodley, D. (2003). An efficient gene transduction system for studying gene function in primary human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 193–199.
- Cook, P. W., Pittelkow, M. R., & Shipley, G. D. (1991). Growth Factor-Independent Proliferation of Normal Human Neonatal Keratinocytes : Production of Autocrine- and Paracrine-Acting Mitogenic Factors. *Journal of Cellular Physiology*, 289, 277–289.

- Csoka, A. B., Frost, G. I., & Stern, R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 499–508.
- Deed, R. D., Ooney, P. R., Umar, P. K., Orton, J. D. N., Mith, J. S., Reemont, A. J. F., & Umar, S. K. (1997). Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *International Journal of Cancer*, 256(December 1996), 251–256.
- Eckert, R. L., Broome, Ñ. A., Ruse, Ñ. M., & Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase Function in Epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*.
- Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., ... Tschachler, E. (2000). Terminal Differentiation of Human Keratinocytes and Stratum Corneum Formation is Associated with Caspase-14 Activation, 1996–1999.
- Elias, P. M., Hachem, J.-P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B. E., & Feingold, K. R. (2003). pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Farwick, M., Gauglitz, G., Pavicic, T., Köhler, T., Wegmann, M., Schwach-Abdellaoui, K., ... Korting, H. C. (2011). Fifty-kDa hyaluronic acid upregulates some epidermal genes without changing TNF- α expression in reconstituted epidermis. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(4), 210–7. doi:10.1159/000324296
- Fortunel, N. O., & Martin, M. T. (2012). Cellular organization of the human epidermal basal layer: clues sustaining a hierarchical model. *International Journal of Radiation Biology*, 88(10), 677–81. doi:10.3109/09553002.2012.706359
- Frankart, A., Malaisse, J., De Vuyst, E., Minner, F., de Rouvroit, C. L., & Poumay, Y. (2012). Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Experimental Dermatology*, 21(11), 871–5. doi:10.1111/exd.12020
- Fraser, J. R., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242(1), 27–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9260563>
- Freinkel, R., & Woodley, D. (2001). The biology of the skin. *New York; London: Parthenon Publishing Group*.
- Frost, G., & Stern, R. (1997). A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents. *Anal Biochem*, 251 (2), 263–9.
- Ghersetich, I., Lotti, T., Campanile, G., Grappone, C., & Dini, G. (1994). Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *The Journal of Investigative Dermatology*, 33 (2), 119–22.
- Ghosh, P., Hutadilok, N., Adam, N., & Lentini, A. (1994). Interactions of hyaluronan (hyaluronic acid) with phospholipids as determined by gel permeation chromatography,

- multi-angle laser-light-scattering photometry and ¹H-NMR spectroscopy. *International Journal of Biology Macromol*, 16 (5), 237–44.
- Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sciences*, 80(21), 1921–43. doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037
- Goding, C. R. (2007). Melanocytes: the new Black. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(2), 275–9. doi:10.1016/j.biocel.2006.10.003
- Gushulak, L., Hemming, R., Martin, D., Seyrantepe, V., Pshezhetsky, A., & Triggs-Raine, B. (2012). Hyaluronidase 1 and β -hexosaminidase have redundant functions in hyaluronan and chondroitin sulfate degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16689–97. doi:10.1074/jbc.M112.350447
- Harada, H., & Takahashi, M. (2007). CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5597–607. doi:10.1074/jbc.M608358200
- Hardman, M. J., Sisi, P., Banbury, D. N., & Byrne, C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development*, 1552, 1541–1552.
- Hérin, M. (2012). Syllabus Histologie spéciale fonctionnelle - II (Système tégumentaire).
- Iizuka, H. (1994). Epidermal turnover time. *Journal of Dermatological Science*, 8, 215–217.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., ... Kimata, K. (1999). Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 25085–25092. doi:10.1074/jbc.274.35.25085
- Iyengar, B. (2013). The melanocyte photosensory system in the human skin. *SpringerPlus*, 2(1), 158. doi:10.1186/2193-1801-2-158
- Jadin, L., Wu, X., Ding, H., Frost, G. I., Onclinx, C., Triggs-Raine, B., & Flamion, B. (2008). Skeletal and hematological anomalies in HYAL2-deficient mice: a second type of mucopolysaccharidosis IX? *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(12), 4316–26. doi:10.1096/fj.08-111997
- Johnson, P., Maiti, A., Brown, K. L., & Li, R. (2000). A Role for the Cell Adhesion Molecule CD44 and Sulfation in Leukocyte – Endothelial Cell Adhesion during an Inflammatory Response ? *Biochemical Pharmacology*, 59(99), 455–465.
- Kirschner, N., Haftek, M., Niessen, C. M., Behne, M. J., Furuse, M., Moll, I., & Brandner, J. M. (2011). CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(4), 932–43. doi:10.1038/jid.2010.390
- Knudson, C., & Toole, B. (1985). Changes in the Pericellular Matrix during Differentiation of Limb Bud Mesoderm. *Developmental Biology*, 318, 308–318.

- Kurdykowski, S., Mine, S., Bardey, V., Danoux, L., Jeanmaire, C., Pauly, G., ... Maquart, F. X. (2011). Ultraviolet-B irradiation induces differential regulations of hyaluronidase expression and activity in normal human keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 87(5), 1105–12. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00959.x
- Laurent, U. B. G., Fraser, J. R. E., Engström-Laurent, A., Reed, R. K., Dahl, L. B., & Laurent, T. C. (1992). Catabolism of Hyaluronan in the Knee Joint of the Rabbit. *Matrix*, 12(2), 130–136. doi:10.1016/S0934-8832(11)80054-5
- Lee, J. Y., & Spicer, A. P. (2000). Hyaluronan : a multifunctional , megaDalton , stealth molecule, 581–586.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Mack, J. a, Feldman, R. J., Itano, N., Kimata, K., Lauer, M., Hascall, V. C., & Maytin, E. V. (2012). Enhanced inflammation and accelerated wound closure following tetraphorbol ester application or full-thickness wounding in mice lacking hyaluronan synthases Has1 and Has3. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(1), 198–207. doi:10.1038/jid.2011.248
- Madison, K. C. (2003). Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Etre” of the Epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 231–241.
- Malaisse, J., Bourguignon, V., De Vuyst, E., Lambert de Rouvroit, C., Nikkels, A. F., Flamion, B., & Poumay, Y. (2014). Hyaluronan Metabolism in Human Keratinocytes and Atopic Dermatitis Skin Is Driven by a Balance of Hyaluronan Synthases 1 and 3. *The Journal of Investigative Dermatology*, (DOI 10.1038/jid.2014.147). doi:10.1038/jid.2014.147
- Malaisse, J., Hermant, M., Hayez, A., Poumay, Y., & Lambert de Rouvroit, C. (2014). Meaning of relative gene expression in multilayered cultures of epidermal keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 23(10), 754–6. doi:10.1111/exd.12501
- Marcoux, Y. P. Æ. F. D. Æ. S., & Coquette, Æ. A. (2004). A simple reconstructed human epidermis : preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Archives of Dermatological Research*, 203–211. doi:10.1007/s00403-004-0507-y
- Maricich, S. M., Wellnitz, S. a, Nelson, A. M., Lesniak, D. R., Gerling, G. J., Lumpkin, E. a, & Zoghbi, H. Y. (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5934), 1580–2. doi:10.1126/science.1172890
- Markwald, F. G. E. R. R., Fitzharris, T. P., Bank, H., & Bernanke, D. H. (1978). Structural Analyses on the Matrical Organization of Glycosaminoglycans in Developing Endocardial Cushions. *Developmental Biology*, 316, 292–316.
- Martin, D. C., Atmuri, V., Hemming, R. J., Farley, J., Mort, J. S., Byers, S., ... Triggs-Raine, B. L. (2008). A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. *Human Molecular Genetics*, 17(13), 1904–15. doi:10.1093/hmg/ddn088

- Maytin, E. V., Chung, H. H., & Seetharaman, V. M. (2004). Hyaluronan participates in the epidermal response to disruption of the permeability barrier in vivo. *The American Journal of Pathology*, 165(4), 1331–41. doi:10.1016/S0002-9440(10)63391-3
- McMahon, H. T., Missler, M., Li, C., & Siidhof, T. C. (1995). Complexins : Cytosolic Proteins That Regulate SNAP Receptor Function. *Cell*, 83, 111–119.
- Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor.
- Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 705–33. doi:10.1007/s00418-008-0435-6
- Morrison, K. M., Miesegaes, G. R., Lumpkin, E. a., & Maricich, S. M. (2009). Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Developmental Biology*, 336(1), 76–83. doi:10.1016/j.ydbio.2009.09.032
- Nusgens, B. (2010). [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 137 Suppl , S3–S8.
- Olgen, S., Kaessler, A., Nebioğlu, D., & Jose, J. (2007). New potent indole derivatives as hyaluronidase inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design*, 70(6), 547–51. doi:10.1111/j.1747-0285.2007.00590.x
- Pasonen-Seppänen, S., Karvinen, S., Törrönen, K., Hyttinen, J. M. T., Jokela, T., Lammi, M. J., ... Tammi, R. (2003). EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 120(6), 1038–44. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12249.x
- Passi, A., Sadeghi, P., Kawamura, H., Anand, S., Sato, N., White, L. E., ... Maytin, E. V. (2004). Hyaluronan suppresses epidermal differentiation in organotypic cultures of rat keratinocytes. *Experimental Cell Research*, 296(2), 123–34. doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.031
- Pendaries, V., Malaisse, J., Pellerin, L., Le Lamer, M., Nachat, R., Kezic, S., ... Simon, M. (2014). Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(12), 2938–46. doi:10.1038/jid.2014.259
- Poumay , Minner Frédéric, Herphelin Françoise, Y. (2010). Study of Epidermal Differentiation in Human Keratinocytes Cultured in Autocrine Conditions. *Epidermal Cells*, 585(DOI 10.1007/7651_2013_40), 71–82. doi:10.1007/978-1-60761-380-0
- Poumay, Y., & Coquette, A. (2007). Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Archives of Dermatological Research*, 298(8), 361–9. doi:10.1007/s00403-006-0709-6
- Poumay, Y., & Pittelkow, M. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *Journal of Investigative Dermatology*, 104 (2), 271–6.

- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x
- Puissant, E., Gilis, F., Dogné, S., Flamion, B., Jadot, M., & Boonen, M. (2014). Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 15(5), 500–15. doi:10.1111/tra.12162
- Puré, E., & Assoian, R. K. (2009). Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. *Cellular Signalling*, 21(5), 651–5. doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.024
- Rawlings, A., Scott, I., Harding, C., & Bowser, P. (1994). Stratum corneum moisturization at molecular level. *The Journal of Investigative Dermatology*.
- Rheinwald, J. G., & Green, H. (1975). Formation of a Keratinizing Epithelium in Culture by a Cloned Cell Line Derived from a Teratoma. *Cell*, 6(November).
- Rilla, K. (2002). Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense hyaluronan synthase 2 (Has2) genes. *Journal of Cell Science*, 115(18), 3633–3643. doi:10.1242/jcs.00042
- Rilla, K., Oikari, S., Jokela, T. a, Hyttinen, J. M. T., Kärnä, R., Tammi, R. H., & Tammi, M. I. (2013). Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5973–83. doi:10.1074/jbc.M112.443879
- Rilla, K., Pasonen-Seppänen, S., Rieppo, J., Tammi, M., & Tammi, R. (2004). The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(4), 708–14. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23409.x
- Rilla, K., Siiskonen, H., Spicer, A. P., Hyttinen, J. M. T., Tammi, M. I., & Tammi, R. H. (2005). Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31890–7. doi:10.1074/jbc.M504736200
- Rooney, P., Kumar, S., Ponting, J., & Wang, M. (1995). The role of hyaluronan in tumor neovascularization. *Int. J. Cancer*, 636, 632–636.
- Sakai, S., Yasuda, R., Sayo, T., Ishikawa, O., & Inoue, S. (2000). Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *The Journal of Investigative Dermatology*, 114(6), 1184–7. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00992.x
- Shirali, A., & Goldstein, D. (2008). Activation of the innate immune system by the endogenous ligand hyaluronan. *Curr Opin Organ Transplant*, 13(1):20–5.
- Stern, R. (2003). Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*, 13(12), 105R–115R. doi:10.1093/glycob/cwgl12

- Stern, R. (2004). Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*, 83, 317–25.
- Stern, R., & Maibach, H. I. (2008). Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clinics in Dermatology*, 26(2), 106–22.
doi:10.1016/j.clindermatol.2007.09.013
- Tammi, R., Rilla, K., Pienimäki, J.-P., MacCallum, D. K., Hogg, M., Luukkonen, M., ... Tammi, M. (2001). Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 35111–35122.
- Toole, B. P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 528–39. doi:10.1038/nrc1391
- Turley, E. a, Noble, P. W., & Bourguignon, L. Y. W. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4589–92.
doi:10.1074/jbc.R100038200
- Underhill, C. (1992). CD44 : The hyaluronan receptor. *Journal of Cell Science*, 298, 293–298.
- Verdier-sévrain, S., & Bonté, F. (2007). Skin hydration : a review on its molecular mechanisms, 75–82.
- Watt, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353(1370), 831–7. doi:10.1098/rstb.1998.0247
- Weigel, P. H., Hascall, V. C., & Tammi, M. (1997). Hyaluronan synthases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 13997–4000. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9206724>
- Zoltan-Jones, A., Huang, L., Ghatak, S., & Toole, B. P. (2003). Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45801–10. doi:10.1074/jbc.M308168200